



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DEL PAPEL DE LOS COMPONENTES
DE LA RUTA *RAD6/RAD18* DE *Saccharomyces
cerevisiae* EN LA TOLERANCIA AL DAÑO EN EL
DNA DURANTE LA REPLICACIÓN
CROMOSÓMICA**

María de los Ángeles Ortiz Bazán

Madrid, 2014




**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS DEL PAPEL DE LOS COMPONENTES
DE LA RUTA *RAD6/RAD18* DE *Saccharomyces
cerevisiae* EN LA TOLERANCIA AL DAÑO EN EL
DNA DURANTE LA REPLICACIÓN
CROMOSÓMICA**

Memoria presentada por la Lda. en Biología
María de los Ángeles Ortiz Bazán
para optar al grado de Doctora en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC/UAM)
bajo la dirección del Doctor José Antonio Tercero Orduña

La presente tesis doctoral se ha realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM), bajo la dirección del Dr. José Antonio Tercero Orduña.



Fdo.: José Antonio Tercero Orduña

RESUMEN

La ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA, conservada evolutivamente, tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, permitiendo el baipás de lesiones no reparadas en el DNA que impiden el movimiento de las horquillas de replicación. Esta ruta puede subdividirse en dos ramas que muestran dos estrategias de tolerancia al daño en el DNA: síntesis de DNA a través de lesiones (TLS) y un mecanismo alternativo que permite evitar el daño. TLS utiliza polimerasas especializadas de baja fidelidad que pueden replicar directamente a través de las lesiones, mediante un proceso que es frecuentemente mutagénico. Por el contrario, la otra rama de la ruta lleva a cabo el baipás de las lesiones mediante un cambio de molde transitorio, en el que la cadena naciente bloqueada utiliza la cadena no dañada y recién sintetizada de la cromátida hermana como molde para la replicación de la zona de la lesión, en un proceso que resulta libre de errores.

En esta tesis, hemos analizado la contribución de las dos ramas de la ruta *RAD6/RAD18* a la tolerancia a las lesiones en el DNA que bloquean la replicación cromosómica, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico y el compuesto alquilante metil metanosulfonato (MMS) como agente genotóxico. Hemos encontrado que la rama libre de errores, mediada por Rad5, tiene el papel principal en esta respuesta, mientras que las polimerasas de síntesis a través de lesiones tienen solo una contribución menor. Hemos mostrado también que Rad5 es absolutamente necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS, lo que indica una función directa de esta proteína en las horquillas de replicación para la tolerancia al daño en el DNA. Además, hemos encontrado que las actividades E3-ubiquitina ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la función de esta proteína durante la replicación cromosómica en presencia de daño en el DNA, y que estas actividades operan secuencialmente, no independientemente. Apoyando su papel específico durante la replicación, hemos mostrado también que la proteína Rad5 tiene un pico de expresión durante la fase S y que forma focos nucleares en respuesta al daño en el DNA durante la fase S. Si bien todos estos resultados indican una función de Rad5 acoplada a la replicación del DNA, hemos encontrado que la expresión de esta proteína después de que la mayor parte de la replicación del genoma se haya completado revierte el efecto causado en su ausencia por el MMS durante la fase S, lo que sugiere que también es posible un modo de acción post-replicativo de Rad5.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis indican que la rama libre de errores de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA, dependiente de Rad5, constituye un sistema eficiente que asegura la compleción de la replicación cromosómica y la viabilidad celular bajo condiciones de daño en el DNA, al mismo tiempo que minimiza el riesgo de mutagénesis, contribuyendo al mantenimiento de la integridad del genoma.

SUMMARY

The evolutionarily conserved *RAD6/RAD18* pathway of DNA damage tolerance plays a crucial role in genome stability maintenance, allowing the bypass of unrepaired DNA lesions that hamper replication forks. This pathway can be subdivided into two branches that show two strategies of DNA damage tolerance: translesion DNA synthesis (TLS) and the alternative damage avoidance subpathway. TLS uses specialized, low-fidelity DNA polymerases that can replicate directly across the lesions, in a process that is frequently mutagenic. In contrast, the damage avoidance branch mediates lesion-bypass by transient template switching, in which the blocked DNA nascent strand uses the newly synthesized undamaged strand of the sister chromatid as a template for replication over the DNA lesion, in a process that results error-free.

In this PhD thesis, we have analysed the contribution of the two branches of the *RAD6/RAD18* pathway to the tolerance of chromosome replication-blocking DNA lesions, using *Saccharomyces cerevisiae* as a eukaryotic model and the alkylating compound methyl methanesulfonate (MMS) as a DNA damaging-agent. We have found that the error-free sub-pathway, mediated by Rad5, has the principal role in this cellular response, whereas translesion synthesis polymerases make only a minor contribution. We have also shown that Rad5 is absolutely required for the progression of replication forks through MMS-damaged DNA, which indicates a direct function of this protein at forks for DNA damage tolerance. Moreover, we have found that the E3-ubiquitin ligase and ATPase/helicase activities of Rad5 are necessary for the function of this protein during chromosome replication in the presence of DNA damage, and that these activities operate sequentially, not independently. Supporting its specific role during replication, we have also shown that the Rad5 protein has a peak of expression during S-phase and that it forms nuclear foci in response to DNA damage during S-phase. While all these results indicate a Rad5 function coupled to DNA replication, we have found that the expression of this protein after bulk genome replication reverts the effects caused by MMS in its absence during S-phase, suggesting that a post-replicative mode of action of Rad5 is also possible.

Altogether, the results obtained in this PhD thesis indicate that the error-free, Rad5-dependent, branch of the *RAD6/RAD18* pathway of DNA damage tolerance constitutes a efficient system that ensures the completion of chromosome replication and cell viability under DNA-damaging conditions while minimising the risk of mutagenesis, thereby contributing to genome integrity maintenance.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	19
INTRODUCCIÓN	23
1. DAÑO EN EL DNA Y ESTABILIDAD DEL GENOMA	25
1.1. Tipos de daño en el DNA	25
2. DETECCIÓN Y RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA	27
3. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA.....	28
3.1. Reversión directa del daño en el DNA	28
3.2. Reparación de apareamientos erróneos (MMR)	28
3.3. Reparación por escisión de bases (BER).....	29
3.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER).....	29
3.5. Reparación de roturas de doble cadena	30
4. TOLERANCIA AL DAÑO EN EL DNA	32
4.1. Activación y desactivación de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA	33
4.2. Tolerancia al daño en el DNA mediante síntesis a través de lesiones.....	35
4.3. Rama libre de error dependiente de Rad5 de tolerancia al daño en el DNA	38
4.4. Balance entre los mecanismos de síntesis a través de lesiones y cambio de molde para el <i>baipás</i> del daño en el DNA	43
4.5. Dónde y cuándo actúan los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA	44
OBJETIVOS.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. MATERIALES	51
1.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	52
1.3. Plásmidos	52
1.4. Oligonucleótidos	53
1.5. Medios de cultivo.....	55
1.6. Anticuerpos.....	56
1.7. Reactivos y enzimas.....	56
2. MÉTODOS	57
2.1. Cultivo y transformación de <i>E. coli</i>	57
2.2. Cultivos celulares de <i>S. cerevisiae</i> y sincronización en el ciclo celular.....	57
2.3. Construcción de las cepas de levaduras.....	58
2.4. Citometría de flujo	59
2.5. Ensayos de sensibilidad al tratamiento con MMS	60
2.6. Observación de células mediante microscopía de fluorescencia.....	60
2.7. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos	60
2.8. Ensayos de sustitución de isótopos de densidad.....	62
2.9. Hibridación de DNA con sondas radiactivas	64
2.10. Extracción de proteínas.....	65
2.11. Electroforesis de proteínas e inmunoblot	66
2.12. Ensayos de actividad quinasa <i>in situ</i> para Rad53.....	67
RESULTADOS	69
1. ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DE LA RUTA RAD6/RAD18 A LA TOLERANCIA AL DAÑO EN EL DNA DURANTE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA.....	71
1.1. Progresión en la fase S y viabilidad de las células carentes de cada una de las polimerasas de síntesis a través de lesiones en condiciones de daño en el DNA causado por el MMS	71
1.2. Las polimerasas de síntesis a través de lesiones pueden sustituirse entre sí para responder al daño en el DNA causado por el MMS	73
1.3. Progresión en la fase S y viabilidad de las células carentes de la rama de tolerancia al daño en el DNA dependiente de Rad5 en condiciones de daño en el DNA causado por el MMS	75
1.4. Rad5 es fundamental para la respuesta celular al daño en el DNA ocasionado por el MMS durante la replicación cromosómica.....	76

1.5. Viabilidad de las células <i>tlsΔ</i> y <i>rad5Δ</i> tras el tratamiento con distintas dosis de MMS durante la fase S	80
2. CONSECUENCIAS DEL DAÑO EN EL DNA CAUSADO POR EL MMS EN LA PROGRESIÓN DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN	83
2.1. Rad5 es necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado	83
3. ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE RAD5 EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA DURANTE LA FASE S	88
3.1. Las actividades E3 ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la respuesta al daño en el DNA inducido por MMS en la fase S.....	88
3.2. Ubc13 es necesaria para la respuesta al daño en el DNA inducido por MMS en la fase S	91
3.3. Viabilidad de los mutantes puntuales de RAD5 tras el tratamiento con distintas dosis de MMS durante la fase S.....	93
3.4. Las proteínas mutantes de Rad5 se expresan al mismo nivel que la proteína silvestre..	94
3.5. La progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado es defectiva en ausencia de las actividades catalíticas de Rad5.....	96
4. REGULACIÓN DE RAD5	99
4.1. Rad5 se encuentra regulada en el ciclo celular y alcanza niveles máximos en la fase S	99
4.2. Los niveles de Rad5 no están regulados en respuesta al daño en el DNA	101
4.3. Rad5 forma focos nucleares en respuesta al daño en el DNA.....	103
4.4. La formación de focos nucleares de Rad5 es independiente de sus actividades catalíticas.....	104
4.5. Los focos de Rad5 se forman en respuesta a varios tipos de daño en el DNA, pero no como consecuencia del estrés replicativo	105
4.6. La relocalización nuclear de Rad5 es independiente de Rad18 y del checkpoint de la fase S	108
5. REVERSIBILIDAD DEL DEFECTO CAUSADO POR LA CARENCIA DE RAD5 DURANTE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN PRESENCIA DE DAÑO EN EL DNA.....	110
5.1. Las consecuencias del tratamiento con MMS durante la replicación cromosómica en células carentes de Rad5 son reversibles mediante nueva expresión de esta proteína.....	110
DISCUSIÓN	115
1. Las polimerasas de síntesis a través de lesiones tienen un papel minoritario en la tolerancia al daño en el DNA originado por el MMS durante la replicación cromosómica	117
2. Posible significado evolutivo de la existencia de las polimerasas de TLS	118
3. La rama libre de errores dependiente de Rad5 de la ruta RAD6/RAD18 es la principal responsable de la tolerancia al daño en el DNA originado por el MMS durante la replicación cromosómica	119
4. Las actividades ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la tolerancia al daño en el DNA.....	120
5. Rad5 es necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado.....	121
6. Rad5 está regulado en el ciclo celular.....	123
7. La localización de Rad5 está regulada en respuesta a la presencia de daño en el DNA ..	124
8. Rad5 puede actuar después de que la mayor parte del genoma se haya replicado	127
9. La tolerancia al daño en el DNA y su implicación en cáncer.....	128
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135

ABREVIATURAS

AAA+	<i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>	ATPasas asociadas con diversas actividades celulares
AEP	<i>Archaeo-eukaryotic primase</i>	Primasa arqueo-eucariota
AP	<i>Apurinic or apyrimidinic site</i>	Sitio apurínico o apirimidínico
APC	<i>Anaphase promoting complex</i>	Complejo promotor de anafase
ARS	<i>Autonomously replicating sequence</i>	Secuencia de replicación autónoma
BER	<i>Base excision repair</i>	Reparación por escisión de bases
BIR	<i>Break induced repair</i>	Replicación inducida por rotura
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	Seroalbúmina bovina
C-terminal		Carboxilo-terminal
CPD	<i>Cyclobutane pyrimidine dimer</i>	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DDT	<i>DNA damage tolerance</i>	Tolerancia al daño en el DNA
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
DSB	<i>Double strand break</i>	Rotura de doble cadena de DNA
DSBR	<i>Double strand break repair</i>	Reparación de roturas de doble cadena en el DNA
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	Proteína fluorescente verde
HH	<i>Heavy-heavy</i>	Pesado-pesado
HJ	<i>Holliday junction</i>	Estructura o unión de Holliday
HL	<i>Heavy-light</i>	Pesado-ligero
HR	<i>Homologous recombination</i>	Recombinación homóloga
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	Peroxidasa de rábano
HU	<i>Hydroxyurea</i>	Hidroxiurea
MMR	<i>Mismatch repair</i>	Reparación de apareamientos erróneos
MMS	<i>Methyl methanesulfonate</i>	Metil metanosulfonato
N-terminal		Amino-terminal
NER:	<i>Nucleotide excision repair</i>	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>	Reparación por unión de extremos no homólogos
ORI	<i>Origin of replication</i>	Origen de replicación
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	Antígeno nuclear de células proliferativas

PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>	Electroforesis en gel de campo pulsado
PIP	<i>PCNA-interacting protein</i>	Dominio de interacción proteína-PCNA
Pol	<i>Polymerase</i>	Polimerasa
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>	Especies reactivas del oxígeno
RPA	<i>Replication protein A</i>	Proteína de replicación A
SCJs	<i>Sister chromatid junctions</i>	Uniones de cromátidas hermanas
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>	Dodecil sulfato sódico
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand annealing</i>	Reasociación de cadenas dependiente de síntesis
SSA	<i>Single strand annealing</i>	Reasociación de cadenas sencillas
SSB	<i>Single strand break</i>	Rotura de cadena sencilla
ssDNA	<i>Single stranded DNA</i>	DNA de cadena sencilla
TAE	<i>Tris/Acetate/EDTA</i>	Tris/Acetato/EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>	Tampón Tris-salino
TBST	<i>Tris-buffered saline/Tween20</i>	Tampón Tris-salino/Tween20
TE	<i>Tris/EDTA</i>	Tris/EDTA
TGS	<i>Tris/Glycine/SDS</i>	Tris/Glicina/SDS
TLS	<i>Translesion syntesis</i>	Síntesis a través de lesiones
Tm	<i>Melting temperature</i>	Temperatura de fusión
UBM	<i>Ubiquitin-binding motif</i>	Motivo de unión a ubiquitina
UBZ	<i>Ubiquitin-binding zinc finger</i>	Motivo de unión a ubiquitina
UFC		Unidad formadora de colonia
UV	<i>Ultraviolet</i>	Ultravioleta
XPV	<i>Xeroderma pigmentosum variant</i>	Variante de xerodermia pigmentosa

INTRODUCCIÓN

1. DAÑO EN EL DNA Y ESTABILIDAD DEL GENOMA

La mayoría de los organismos almacenan su información genética en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA), que se encuentra compactado en los cromosomas. En cada ciclo de división celular, estos deben replicarse con absoluta precisión antes de segregarse en la mitosis a las células hijas, de manera que la integridad del genoma se mantenga de generación en generación. El éxito de este proceso es esencial para la viabilidad celular, y los fallos en el mismo son una de las principales causas de inestabilidad genómica. A pesar de su complejidad, en situaciones normales la replicación del DNA es un proceso con una fidelidad muy alta, con una tasa de error en eucariotas inferior a 10^{-10} mutaciones por base por división celular (Kunkel y Bebenek, 2000). Sin embargo, la integridad del genoma se encuentra constantemente amenazada por multitud de agentes de diversa naturaleza que provocan lesiones en el material genético. El daño en el DNA puede ocasionar alteraciones en su composición o en su estructura, que son particularmente peligrosas durante la fase S del ciclo celular, ya que en muchas ocasiones las lesiones en el DNA interfieren directamente con las horquillas de replicación, generando paradas y colapsos de las mismas que pueden dar lugar a una duplicación incompleta o defectuosa del genoma, e incluso a roturas cromosómicas.

Las células necesitan detectar el daño en el material genético y dar solución a la existencia del mismo, ya que la presencia de lesiones en el DNA puede suponer una fuente de mutaciones y de inestabilidad genómica y, en eucariotas superiores, una causa potencial de cáncer y otras enfermedades (Aguilera y Gomez-Gonzalez, 2008; Branzei y Foiani, 2010). Para hacer frente a estos problemas, las células eucariotas disponen de rutas que permiten la reparación o tolerancia de las lesiones en el DNA, y de mecanismos de vigilancia -*checkpoints*- que detectan las perturbaciones y permiten coordinar la reparación del daño y el restablecimiento de la replicación con la progresión en el ciclo celular (Branzei y Foiani, 2008; Friedel *et al*, 2009; Segurado y Tercero, 2009).

Gran parte de nuestra comprensión de estos procesos se debe a la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariótico de trabajo. Su facilidad de manipulación genética, el conocimiento de su genoma, así como la conservación evolutiva de los mecanismos moleculares básicos, han convertido a este organismo en una herramienta de trabajo extremadamente útil en investigación. Los estudios realizados en esta tesis se han llevado a cabo empleando esta levadura como modelo.

1.1. Tipos de daño en el DNA

Las células se encuentran continuamente sometidas a la acción de numerosos agentes nocivos capaces de causar lesiones en su material genético. Algunos de estos agentes, así como las lesiones a las que dan lugar y los mecanismos por los que

habitualmente se reparan, se recogen en la figura I1. En general, los agentes que dañan el DNA pueden clasificarse como endógenos, cuando el daño es resultado del propio metabolismo de las células, o como exógenos, cuando el origen del daño es una fuente ambiental, externa a la célula.

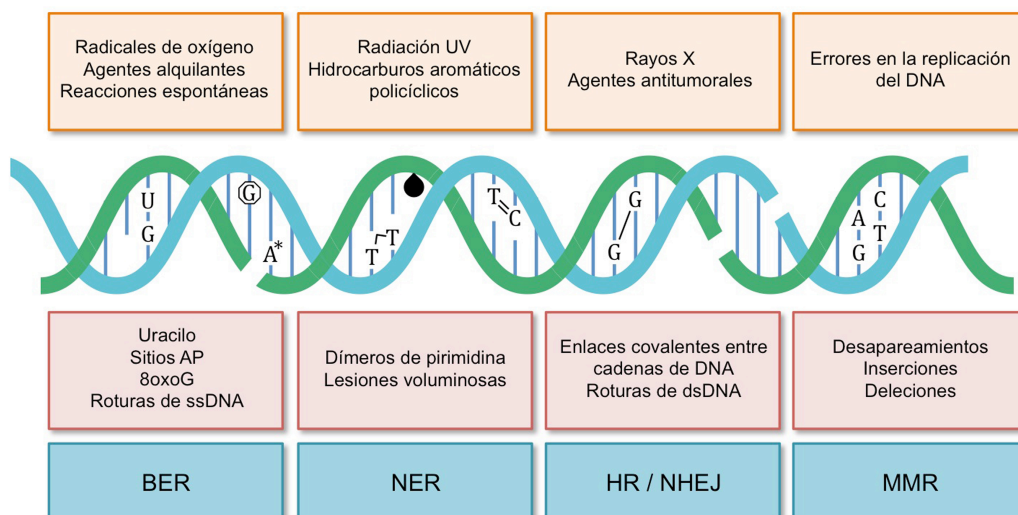


Figura I1. Tipos de lesiones en el DNA y sus principales mecanismos de reparación. En la parte superior -en recuadros naranjas- se recogen diversos agentes causantes de daño en el DNA, bajo los cuales -recuadrados en rojo- se recogen los tipos de lesiones que originan, así como -en recuadros azules- los mecanismos que se emplean para repararlos. (Basada en Hoeijmakers (2001)).

El *daño endógeno*, en gran parte consecuencia de reacciones de hidrólisis y oxidación que sufre el DNA, da lugar con frecuencia a la modificación o pérdida de bases, lo cual puede originar mutaciones (Barnes y Lindahl, 2004). Por ejemplo, las especies reactivas del oxígeno (ROS), productos del metabolismo normal de las células, pueden causar diversas lesiones en las bases del DNA, así como roturas de cadena sencilla en el mismo (SSB) (Hoeijmakers, 2001). Por otra parte, durante el propio metabolismo del DNA se pueden incorporar bases incorrectas, o inusuales, como análogos de bases o uracilo. También se pueden convertir lesiones relativamente benignas, como SSB, en otras más peligrosas, como roturas de doble cadena (DSB).

El *daño exógeno* se debe a la acción de agentes ambientales, como la luz ultravioleta (UV) o las radiaciones ionizantes, así como de compuestos químicos de diversa naturaleza a los que las células se ven expuestas. Estas lesiones pueden causar distorsiones en la hélice de DNA capaces de bloquear las horquillas de replicación (Husain *et al*, 1988; Pearlman *et al*, 1985). En esta tesis se ha utilizado como modelo de agente genotóxico el agente alquilante metil metanosulfonato (MMS), ampliamente empleado en los estudios de la respuesta celular al daño en el material genético. El MMS causa una lesión letal, la 3-metiladenina (3meA), que inhibe a la DNA polimerasa *in vitro*, y necesita ser reparada activamente (Larson *et al*, 1985).

2. DETECCIÓN Y RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA

Durante la replicación del DNA, las células se ven expuestas a multitud de agentes que provocan lesiones en el material genético. Al alcanzar estas lesiones, las horquillas de replicación pueden detenerse, corriendo el riesgo de quedar bloqueadas o colapsar. El *checkpoint* de la fase S es un mecanismo de vigilancia que permite responder al daño en el DNA y a las perturbaciones en la replicación coordinando una respuesta global necesaria para el mantenimiento de la integridad genómica (Segurado y Tercero, 2009). Consiste en una ruta de transducción de señales conservada evolutivamente (Paulovich y Hartwell, 1995; Zhou y Elledge, 2000) que, en *S. cerevisiae*, está mediada por las quinasas Mec1 y Rad53 (ATR y CHK2 en células humanas).

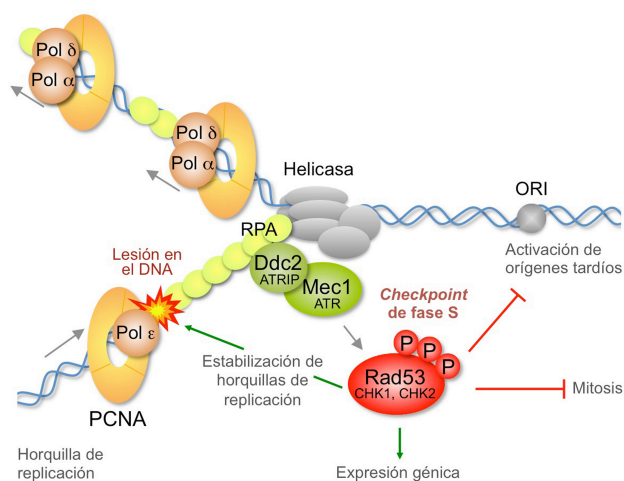


Figura I2. El *checkpoint* de la fase S. Representación esquemática de la activación del *checkpoint* de la fase S, así como de las respuestas que desencadena (Basada en Segurado y Tercero (2009)).

Este *checkpoint* se activa cuando la replicación cromosómica tiene lugar en presencia de daño en el DNA o en situaciones de estrés replicativo. Su activación (Figura I2) comienza si al encontrarse el replisoma con una lesión se produce el desacoplamiento de la helicasa y las polimerasas replicativas, lo que da lugar a la acumulación de DNA de cadena sencilla (ssDNA) que se recubre por RPA (Byun *et al*, 2005; Nedelcheva *et al*, 2005; Sogo *et al*, 2002; You *et al*, 2002). Este DNA de cadena sencilla recubierto por RPA recluta a la proteína sensora Mec1 a través de su subunidad reguladora Ddc2 (ATRIP en células humanas) a las zonas de ssDNA-RPA en las horquillas bloqueadas (Melo *et al*, 2001; Zou y Elledge, 2003), desencadenando la cascada de activación del *checkpoint*, que dará lugar a la fosforilación y activación de Rad53 (Figura I2) (Sanchez *et al*, 1996; Sun *et al*, 1996). Rad53 es una quinasa efectora que, activada, frena el progreso de la fase S, inhibiendo la activación de orígenes de replicación tardíos (Santocanale y Diffley, 1998; Santocanale *et al*, 1999; Shirahige *et al*, 1998), mientras que mantiene estables y funcionales las horquillas de replicación (Lopes *et al*, 2001; Sogo

et al, 2002; Tercero y Diffley, 2001), induce la expresión de genes que participan en la respuesta al daño en el DNA y previene la entrada en mitosis (Figura I2) (Allen *et al*, 1994). En conjunto, estas respuestas mantienen a las horquillas de reparación capaces de reiniciar la replicación una vez que el problema se haya solucionado.

3. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO EN EL DNA

Para garantizar el mantenimiento de su información genética y la estabilidad de sus genomas, las células necesitan, además de un *checkpoint* activo, diversos mecanismos de reparación que permitan hacer frente a las lesiones en el material genético. A continuación se describen los mecanismos de reparación más importantes en células eucariotas, con especial atención a los descritos en *S. cerevisiae*.

3.1. Reversión directa del daño en el DNA

El mecanismo más simple y eficiente de reparación es la reversión directa del daño, mediante una reacción en un solo paso mediada por una enzima especializada (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013). Sin embargo, la reversión directa solo puede actuar sobre un número muy limitado de lesiones en el DNA. El ejemplo más claro de este tipo de reacción es la fotorreactivación (Cook, 1970; Rupert, 1975) de los dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) por una fotoliasa de DNA. *S. cerevisiae* posee una fotoliasa específica para CPDs (Phr1), que se activa por la absorción de energía de luz azul o UV (de entre 300 y 500 nm) la cual se transfiere al CPD dando lugar a una especie inestable que al romperse restaura la estructura del DNA (Sancar, 2003). Otro ejemplo de este mecanismo es la reacción llevada a cabo por la metiltransferasa Mgt1 de levaduras (MGMT en mamíferos). Mgt1 repara las O⁶-metilguanina y O⁴-metiltimina transfiriendo de forma irreversible el grupo metilo al centro activo de la enzima (Sassanfar *et al*, 1991; Sassanfar y Samson, 1990; Xiao *et al*, 1991), tras lo cual pierde su capacidad catalítica, por lo que constituye un mecanismo de reparación muy costoso energéticamente.

3.2. Reparación de apareamientos erróneos (MMR)

La ruta de MMR elimina los apareamientos de bases incorrectos originados por errores durante la síntesis del DNA que escapan a la actividad correctora de las polimerasas, así como las pequeñas inserciones y deleciones que se pueden producir durante una replicación defectuosa del material genético (Figura I1) (Harfe y Jinks-Robertson, 2000; Hsieh y Yamane, 2008; Kunkel y Erie, 2005). Esta ruta funciona durante la fase S y es fundamental para limitar la mutagénesis. MMR comienza con el reconocimiento del error por la proteína Msh2, que forma un heterodímero con Msh6 o con Msh3 (Kolodner y Marsischky, 1999). A continuación se reclutan los complejos

Mlh1/Pms1 (MLH1/PMS2 en humanos), Mlh1/Mlh2 (MLH1/PMS1 en humanos) y Mlh1/Mlh3, que interaccionan con PCNA, lo cual dirige a las proteínas de MMR a los sitios de nueva síntesis de DNA, contribuyendo a la discriminación de la nueva cadena. A su vez permiten el reclutamiento de Exo1, que degrada la región de DNA que contiene la lesión. Seguidamente, la polimerasa (Pol) δ rellena el hueco de DNA de cadena sencilla, estabilizado por RPA, tras lo cual la DNA ligasa I (Cdc9 en *S. cerevisiae*) sella la rotura para completar el proceso de reparación (Jiricny, 2006; Kunkel y Erie, 2005).

3.3. Reparación por escisión de bases (BER)

La mayor parte de las lesiones en el DNA causadas por daño oxidativo, alquilación, hidrólisis espontánea, desaminación o incorporación de bases inapropiadas como el uracilo, se eliminan por la ruta BER (Figura I1). Esta ruta requiere la acción secuencial de varias actividades que modifican el DNA (Hoeijmakers, 2001). En primer lugar, una DNA-N-glicosilasa corta el enlace N-glicosídico entre la base dañada o inusual y la desoxirribosa, generando un sitio AP (sitio apurínico o apirimidínico). En levaduras existen cinco DNA-glicosilasas, pertenecientes a dos clases: la primera, formada por enzimas monofuncionales que solo catalizan el corte del enlace N-glicosídico, como Ung1 o Mag1, que rompe el enlace glicosídico entre la 3meA y la desoxirribosa (Chen *et al*, 1990); y la segunda clase, integrada por enzimas bifuncionales DNA-glicosilasas/AP-lisas que catalizan tanto el corte del enlace N-glicosídico como la eliminación del esqueleto fosfodiéster en los sitios AP, que incluye a Ntg1, Ntg2 y Ogg1. Tras la generación de los sitios AP por la actuación de las glicosilasas, o como consecuencia de la hidrólisis espontánea de bases, las AP-endonucleasas, Apn1 o Apn2 (Popoff *et al*, 1990), se unen a los mismos en DNA de doble cadena y cortan el esqueleto fosfodiéster en el extremo 5' de la lesión. La escisión del azúcar se completa con la eliminación del residuo desoxirribosa-fosfato por la acción de una desoxirribosa-fosfodiesterasa que corta el otro enlace fosfodiéster. La eliminación de los extremos 3' o 5' genera un pequeño hueco en el DNA, que debe ser relleno por Pol ϵ (Wang *et al*, 1993) o Pol δ . Por último, la reparación del DNA se completa por la DNA-ligasa Cdc9.

3.4. Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

La ruta de reparación por escisión de nucleótidos es una vía versátil que reconoce las distorsiones que una lesión ocasiona en el DNA, por lo que puede reparar daños diversos en el material genético. La ruta NER tiene un papel muy importante durante la fase G1 del ciclo celular, eliminando lesiones que pueden bloquear las DNA polimerasas, si bien puede actuar también en otras fases del ciclo. Entre las lesiones en el DNA más importantes que se reparan por NER se encuentran las producidas por la luz UV y las

distorsiones originadas por diferentes compuestos que provocan uniones covalentes entre cadenas del DNA. Además, supone un mecanismo alternativo para la reparación de sitios AP y de bases oxidadas (Figura I1) (Gellon *et al*, 2001; Scott *et al*, 1999; Swanson *et al*, 1999; Torres-Ramos *et al*, 2000). La ruta NER se puede dividir en dos sub-rutas, basándose en el paso de reconocimiento de la lesión. La primera consiste en una *vía de reparación acoplada a la transcripción* (TC-NER), en la que se reparan las cadenas molde de DNA de los genes a medida que se transcriben. La segunda constituye una *vía de reparación genómica global* (GG-NER), que detecta y corrige lesiones que no se encuadran en la anterior vía, si bien es un mecanismo más genérico y menos eficiente.

En *S. cerevisiae*, la detección de la distorsión del DNA que produce el daño se lleva a cabo por Rad4 y Rad23 (XPC y HR23B en humanos), junto con las proteínas Rad16/Rad7/Abf1 (en GG-NER) y Rad26/Rpb9 (en TC-NER). Tras el reconocimiento de la lesión las dos vías convergen y se llevan a cabo dobles incisiones que flanquean la misma. Para ello, en primer lugar se recluta el complejo TFIIH, que determina la zona que se debe eliminar y abre la hélice de DNA en la región de la lesión. Una vez separadas las cadenas, la hebra no dañada se recubre por RPA, mientras que Rad14 (XPA en humanos), se une a la lesión (de Laat *et al*, 1999). Rad14 forma un complejo con Rad1-Rad10 (ERCC1-XPF) (Guzder *et al*, 1996), Rad2 (XPG) interacciona con TFIIH (Lafrance-Vanasse *et al*, 2012), y juntos llevan a cabo la doble incisión de la cadena dañada en los extremos 5' y 3', respectivamente (Evans *et al*, 1997). Tras el corte endonucleolítico, se liberan de la hélice 25-30 nucleótidos, y el hueco resultante se rellena por las DNA polimerasas Pol δ o Pol ϵ y se sella por la DNA ligasa 1 (Budd y Campbell, 1995).

3.5. Reparación de roturas de doble cadena

En los casos anteriores, el daño en el DNA se limita a una de las cadenas del mismo, de modo que, tras eliminar la lesión, la cadena no dañada se usa como molde para completar el proceso de reparación. Sin embargo, algunos agentes que dañan el DNA, como las radiaciones ionizantes, las ROS, o determinados agentes químicos (como la bleomicina, usada en quimioterapia), pueden causar DSB, una de las lesiones más graves que pueden producirse en el DNA (Figura I1). La reparación de las DSB se lleva a cabo por dos vías alternativas: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Branzei y Foiani, 2008; Giglia-Mari *et al*, 2011; Kass y Jasin, 2010; Pardo *et al*, 2009; Wyman y Kanaar, 2006). La actuación de una u otra depende de la fase del ciclo celular. La recombinación homóloga necesita un DNA homólogo que actúe como molde (Heyer *et al*, 2010; Paques y Haber, 1999; Symington, 2002), como una cromátida hermana, por lo que actúa durante las fases S y G2/M. Tras la mitosis y durante G1, la reparación de las DSB se lleva a cabo mediante NHEJ (Heyer *et al*, 2010).

3.5.1. Reparación por unión de extremos no homólogos

La ruta de NHEJ se inicia por el reconocimiento de la lesión por el complejo Ku70/Ku80. Ku se une a los extremos de la rotura protegiéndolos de la degradación, marcándolos como sitios de daño y promueve el reclutamiento del complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2; en humanos MRN, Mre11-Rad50-Nbs1), que lleva a cabo el procesamiento de los extremos de la rotura. Posteriormente se une un tercer complejo, homólogo de la DNA ligasa IV/XRCC4 en humanos, formado por una ligasa específica de NHEJ, Dnl4, y un factor asociado, Lif1, que promueve el procesamiento y relleno del sitio de corte mediante el reclutamiento de la endonucleasa Rad27 y de la polimerasa Pol4. Una vez generados los extremos religables, Dnl4 sella el corte y la reparación se completa (Daley *et al*, 2005; Hefferin y Tomkinson, 2005). Durante el procesamiento del DNA se puede producir la pérdida o sustitución de varios nucleótidos, por lo que el NHEJ puede ser un proceso de reparación mutagénico (Heyer *et al*, 2010; Lieber, 2008; Lieber, 2010).

3.5.2. Reparación por recombinación homóloga

La recombinación homóloga utiliza la invasión de hebra del DNA y la reparación por síntesis de DNA dependiente de molde para dar lugar a una reparación generalmente de alta fidelidad (Amunugama y Fishel, 2012). El proceso se inicia por la unión del complejo MRX y la endonucleasa Sae2 (CtIP en mamíferos) a la DSB (Heyer *et al*, 2010). A continuación se forma una región de ssDNA con extremo 3' por la resección de los extremos de la DSB, que se inicia por el complejo MRX-Sae2 (Clerici *et al*, 2005; Lengsfeld *et al*, 2007) y se extiende por las nucleasa Exo1 o por la acción conjunta de la nucleasa Dna2 y la helicasa Sgs1. Este ssDNA se recubre por RPA, que a través de la interacción con Rad52 se sustituye por Rad51, formándose un filamento nucleoproteico. Este filamento es fundamental para la invasión de hebra en la cromátida homóloga, dando lugar a una estructura temporal de DNA triple en la que ocurre el intercambio de cadenas (Wyman *et al*, 2004). La invasión de hebra desplaza la cadena complementaria original del molde, formándose una estructura con forma de bucle (D-loop) que contiene un molde de DNA con un cebador que una polimerasa puede extender. En este punto, la HR puede proceder de distintas formas (Friedberg, 2005; Krogh y Symington, 2004; Pardo *et al*, 2009; Prado *et al*, 2003; Sung y Klein, 2006; Symington, 2002).

En la ruta clásica de *reparación de roturas de doble cadena (DSBR)*, el extremo 5' del DNA se aparea con la burbuja del D-loop del molde, dando lugar a una doble unión de Holliday (HJ). Una vez que una DNA polimerasa rellena el hueco, es necesario el procesamiento de las HJ para que se separen las dos cadenas de DNA. Este procesamiento puede llevarse a cabo por disolución, mediada por el complejo Sgs1-Top3-Rmi1 (Chang *et al*, 2005; Ira *et al*, 2003; Mullen *et al*, 2005), que resuelve las HJ sin

que se produzcan sobrecruzamientos (Wu y Hickson, 2003) o por el corte endonucleolítico de las uniones producido por Yen1 (GEN1 en mamíferos), Mus81-Mms4 (MUS81-EME1) o por Slx4-Slx1, que según la dirección en la que se produzca dará lugar a entrecruzamientos o fenómenos de conversión génica.

La mayor parte de la recombinación homóloga tiene lugar por la ruta de *reasociación de cadenas dependiente de síntesis o SDSA*. En ella, tras el inicio de la síntesis de DNA después de la invasión de hebra, las cadenas invasoras de ambos extremos de la rotura se separan del molde y se reasocian entre sí para completar la síntesis del DNA. Este tipo de HR podría ocurrir durante el mecanismo de intercambio de molde en la tolerancia del daño en el DNA. Esta ruta evita completamente los sobrecruzamientos, lo que reduce los potenciales reordenamientos genómicos.

En el caso de la que DSB se sitúe entre repeticiones directas de secuencias de DNA, se puede producir la *reasociación de cadenas sencillas o SSA*. Esta ruta conlleva la asociación de ssDNA recubierto por RPA mediado por Rad52 (Krogh y Symington, 2004), pero no involucra la invasión de hebra de un molde homólogo y es independiente de Rad51. Los extremos sobrantes tras la unión de las regiones homólogas son procesados por la nucleasa Rad1-Rad10. Este proceso es mutagénico, ya que elimina el DNA entre las regiones homólogas así como de una de dichas regiones (Heyer *et al*, 2010).

Además, cuando solo un extremo de la rotura encuentra homología, la HR puede ocurrir a través del mecanismo de *replicación inducida por rotura o BIR*. La horquilla de replicación que se forma tras la invasión de hebra de este único DNA homólogo lleva a cabo la replicación hasta el final del cromosoma. Aunque este proceso mantiene la integridad del cromosoma, puede dar lugar a la pérdida de heterocigosidad de toda la región copiada a partir de la DSB (Heyer *et al*, 2010; Signon *et al*, 2001).

4. TOLERANCIA AL DAÑO EN EL DNA

A pesar de la alta eficiencia de los mecanismos de detección y reparación del daño en el material genético, algunas lesiones escapan a su acción, y aquellas presentes en el DNA en el momento de la replicación pueden interferir con las horquillas de replicación. Para la correcta transmisión de la información genética es necesario que el genoma se duplique por completo y de forma precisa, por lo que es crucial hacer frente a las lesiones no reparadas que bloquean las horquillas de replicación. De hecho, las células utilizan estrategias que les permiten afrontar de forma efectiva el daño en el DNA sin eliminar las lesiones en el mismo (Boiteux y Jinks-Robertson, 2013; Chatterjee y Siede, 2013). El concepto de tolerancia al daño en el DNA (DDT) es muy diferente al de reparación del material genético, ya que en lugar de restaurar la estructura y secuencia

del DNA dañado, los mecanismos de DDT permiten el baipás de las lesiones, manteniendo la base o región dañada en una de las cadenas del DNA.

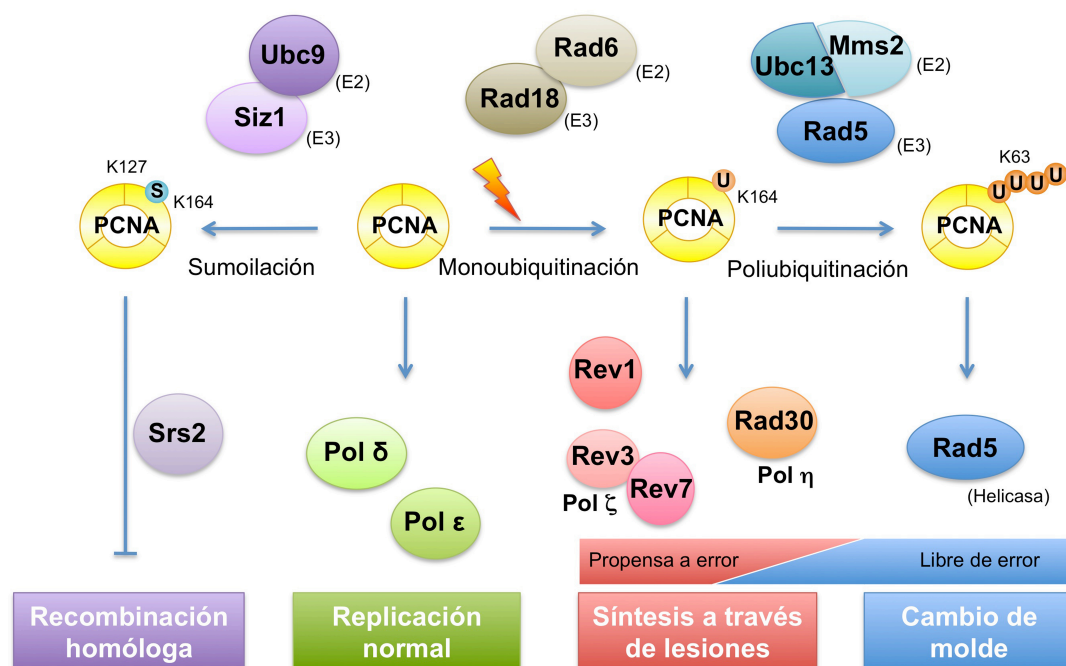


Figura I3. La ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA. La regulación de esta ruta se basa en gran parte en modificaciones post-traduccionales de PCNA. Durante la fase S PCNA se encuentra sumoilado, inhibiendo la recombinación homóloga. En respuesta al daño en el DNA, PCNA puede monoubiquitarse, dando lugar a la actuación de las polimerasas de síntesis a través de lesiones. Además PCNA puede poliubiquitarse activando la rama de cambio de molde dependiente de Rad5.

En células eucariotas, la tolerancia al daño en el DNA está mediada principalmente por la ruta conservada *RAD6/RAD18*, (Figura I3) la cual incluye dos modos de acción: síntesis de DNA a través de lesiones (TLS) y un mecanismo que evita el uso de la cadena dañada como molde para la síntesis de DNA. La síntesis de DNA a través de las lesiones utiliza polimerasas especializadas que replican directamente el molde dañado en un proceso que es con frecuencia propenso a error y una importante fuente de mutagénesis. Por el contrario, en la segunda rama de la ruta, la cadena naciente bloqueada usa la cadena no dañada de la cromátida hermana como molde para replicar la zona que contiene la lesión, y el resultado es libre de error. Los mecanismos de DDT se controlan en gran parte mediante modificaciones post-traduccionales de PCNA, el factor de procesividad de las polimerasas replicativas de DNA (Andersen *et al*, 2008; Chang y Cimprich, 2009; Ulrich, 2005; Ulrich, 2009).

4.1. Activación y desactivación de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA

Cuando la maquinaria replicativa se detiene por la presencia de una lesión en el DNA, puede producirse el desacoplamiento de la helicasa y las polimerasas replicativas,

lo que da lugar a la exposición de fragmentos largos de DNA de cadena sencilla. Este DNA expuesto, que se recubre por RPA, actúa como señal para la unión a la cromatina de Rad18 (Davies *et al*, 2008), una E3 ligasa de ubiquitina que, recluta a la enzima E2 conjugadora de ubiquitina Rad6 con la que forma un heterodímero (Bailly *et al*, 1997) que promueve la monoubiquitilación de PCNA en la lisina 164 (Figuras I3 e I4)(Hoege *et al*, 2002). El ssDNA cubierto por RPA activa también el *checkpoint* de la fase S (Byun *et al*, 2005), sin embargo, a pesar de esta señalización común, no parece existir una interdependencia entre los mecanismos de señalización de ambos procesos (Chang *et al*, 2006; Davies *et al*, 2008). La monoubiquitilación de PCNA da lugar a la sustitución de las polimerasas replicativas por las polimerasas de TLS (Figuras I3 e I4) en las horquillas bloqueadas (Hoege *et al*, 2002; Stelter y Ulrich, 2003). La ubiquitina unida a PCNA actúa a su vez como diana para otra posible modificación: la adición de una cadena de ubiquitinas unidas a través de su lisina 63. La poliubiquitilación de PCNA activa la rama libre de error de tolerancia al daño en el DNA (Figura I3). En *S. cerevisiae*, este proceso se lleva a cabo por el complejo E2 conjugador de ubiquitina Mms2-Ubc13 (MMS2-UVE1 en células humanas) junto con la E3 ubiquitina ligasa Rad5 (Broomfield *et al*, 1998). En células humanas existen dos proteínas homólogas de Rad5 que poliubiquitilan PCNA: SHPRH y HLTF (Motegi *et al*, 2006; Unk *et al*, 2008; Unk *et al*, 2006).

Durante la fase S, en ausencia de daño en el DNA, el complejo Ubc9/Siz1 de *S. cerevisiae*, puede sumoilar PCNA en la lisina 164 (Figura I3) provocando el reclutamiento de la helicasa Srs2, que inhibe la HR (Hoege *et al*, 2002; Papouli *et al*, 2005; Pfander *et al*, 2005; Stelter y Ulrich, 2003). La sumoilación de PCNA facilita su ubiquitilación en respuesta al daño en el DNA, favoreciendo la tolerancia a las lesiones en el material genético y minimizando la recombinación. De hecho, PCNA sumoilada podría ser el sustrato fisiológico de Rad18, al menos en *S. cerevisiae* (Parker y Ulrich, 2012).

Además de Rad18, otras E3 ligasas como RNF8 o CRL4^{CDT2} podrían realizar una pequeña aportación a la monoubiquitilación de PCNA en células de mamífero (Teraí *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2008), cuya relevancia en la activación o regulación de la tolerancia al daño en el DNA aún se desconoce. Del mismo modo, células de ratón que carecen de HLTF/SHPRH muestran una poliubiquitilación de PCNA residual, lo que sugiere que otras proteínas podrían jugar algún papel en esta modificación de PCNA. Un posible candidato sería RNF8, dado que puede poliubiquitilar PCNA *in vitro* (Teraí *et al*, 2010).

La poliubiquitilación de PCNA es un proceso reversible, lo que permite la desactivación de los mecanismos de DDT una vez que se han superado las lesiones capaces de bloquear las horquillas de replicación. En células de mamífero, USP1, una proteasa específica de ubiquitina, elimina la ubiquitina unida a PCNA (Huang *et al*, 2006). La proteasa Ubc10 de *S. cerevisiae*, lleva a cabo la misma función, y puede desubiquitilar

tanto PCNA mono- como diubiquitilado (Gallego-Sanchez *et al*, 2012), lo que sugiere que esta proteasa, y por extensión USP1, podría actuar sobre PCNA poliubiquitilado, causando la desactivación tanto de la rama de TLS como de la dependiente de Rad5. Por el momento se desconoce cómo se regula la función de estas proteasas, aunque se ha propuesto que la irradiación UV inhibe a USP1, lo que permite que se acumule PCNA ubiquitilado y se active la ruta de TLS (Huang *et al*, 2006).

4.2. Tolerancia al daño en el DNA mediante síntesis a través de lesiones

La síntesis de DNA a través de lesiones es un mecanismo que permite el *baipás* directo de las lesiones no reparadas en el DNA. Aunque contribuye a la resistencia a los agentes genotóxicos y es importante para la estabilidad del genoma, es también una fuente de mutagénesis inducida por daño. En el proceso de TLS, la polimerasa replicativa bloqueada se sustituye por una polimerasa especializada capaz de replicar sobre la lesión en el DNA (Lehmann *et al*, 2007). Las polimerasas de TLS son enzimas con baja procesividad y baja fidelidad de síntesis, que carecen de actividad exonucleasa correctora de errores (Kunkel, 2004) y poseen sitios activos flexibles capaces de acomodar las bases modificadas del DNA (Lange *et al*, 2011; Sale, 2013; Waters *et al*, 2009). Estas polimerasas insertan bases correctas o incorrectas frente a una lesión, tras lo cual es necesario un paso de extensión que puede ser realizado por la misma o por otra polimerasa de TLS. A continuación, la polimerasa de TLS se sustituye por una polimerasa replicativa, de alta fidelidad, para continuar con la replicación del DNA.

S. cerevisiae posee tres polimerasas de TLS: Rad30 (Pol η) y Rev1, pertenecientes a la familia Y, y Pol ζ , de la familia B, compuesta por las subunidades Rev3, catalítica, y la accesoria o reguladora Rev7 (Sale, 2013). En células de mamífero existe un mayor número de polimerasas con actividad significativa de síntesis a través de lesiones. Se incluyen cuatro miembros de la familia Y: Pol η (POLH), REV1, Pol κ (POLK) y Pol ι (POLI); una polimerasa de la familia B: Pol ζ , formada por la subunidad catalítica, REV3L, y por REV7 (MAD2L2), y dos polimerasas de la familia A: Pol ν (POLN) and Pol θ (POLQ) (Lange *et al*, 2011; Sale, 2013; Waters *et al*, 2009). Además, una polimerasa humana de la familia AEP recientemente identificada, PrimPol, muestra también actividad TLS *in vitro* e *in vivo* (Bianchi *et al*, 2013; Garcia-Gomez *et al*, 2013; Mouron *et al*, 2013).

Es muy probable que la elección de una u otra polimerasa de TLS se deba principalmente al tipo de daño en el DNA, ya que cada una muestra distinta afinidad por las diversas lesiones en el material genético. En general, se considera que las polimerasas de TLS son propensas a cometer errores, ya que el resultado de su actuación es con frecuencia mutagénico. Sin embargo, dependiendo del tipo de lesión en el DNA y de la polimerasa que se utilice, el resultado puede ser libre de error o

mutagénico (Friedberg *et al*, 2002). Así, Pol ζ extiende apareamientos de bases incorrectos y junto con Rev1 es responsable de gran parte de la mutagénesis inducida por daño. Por su parte, Pol η (que es propensa a cometer errores en DNA no dañado) inserta dos adeninas frente a un dímero de timina (Johnson *et al*, 1999b), la lesión causada por luz UV más frecuente, y el resultado es libre de error.

La monoubiquitilación de PCNA aumenta la afinidad basal de las polimerasas de la familia Y por este factor de procesividad, lo que permite su reclutamiento a los sitios de daño en el DNA (Figura I4). Estas polimerasas contienen motivos de unión a ubiquitina, UBZ y UBM, que junto con sus motivos de interacción con PCNA (PIP) permiten una doble unión a PCNA monoubiquitilado (Bienko *et al*, 2005). Pol ζ carece de dominios de unión a ubiquitina, si bien puede reclutarse a los sitios de daño a través de su interacción con Rev1, que gracias a sus dominios de interacción proteína-proteína puede actuar como plataforma de anclaje para las polimerasas de TLS (Sale, 2013).

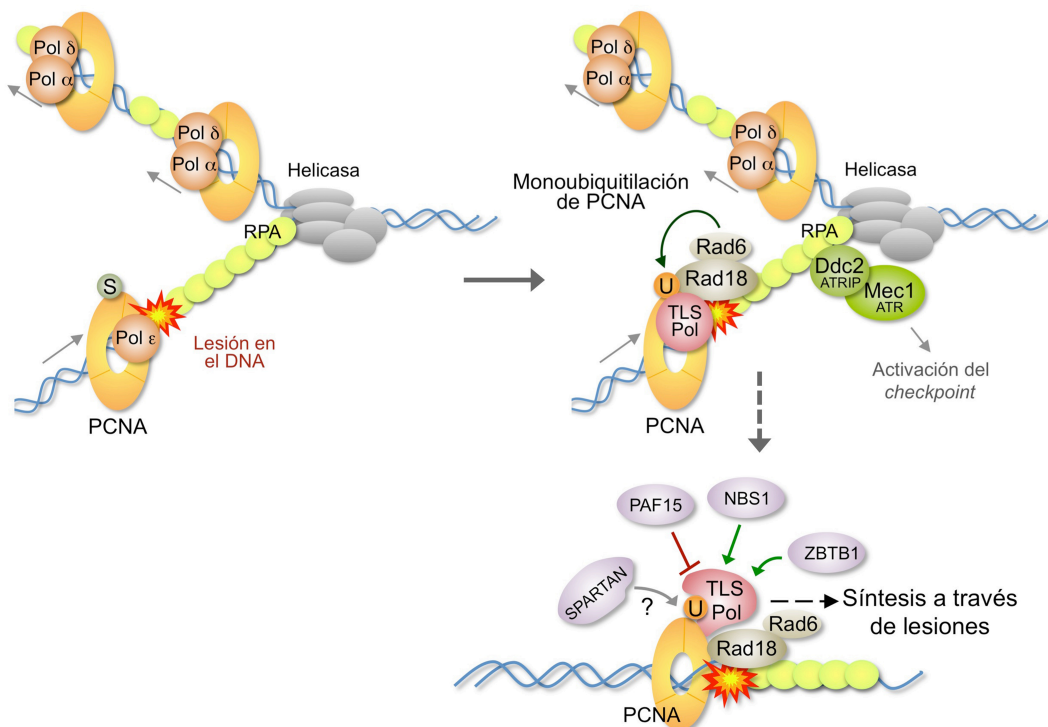


Figura I4. Activación y modulación de la rama de TLS por diversos factores. Cuando la horquilla de replicación encuentra una lesión no reparada en el DNA, la helicasa y las polimerasas replicativas pueden desacoplarse parcialmente, dejando expuestos tramos de DNA de cadena sencilla que se recubren con RPA. Este ssDNA recubierto por RPA actúa como señal para la activación del *checkpoint* de fase S y para el reclutamiento de Rad18, que junto con Rad6 monoubiquitilan PCNA. Esta modificación da lugar al intercambio de las polimerasas replicativas por las polimerasas de TLS. En el panel inferior se muestran -en morado- diversas proteínas que modulan TLS en células humanas.

Aunque está claro que la ubiquitilación de PCNA permite el acceso de las polimerasas de TLS a las lesiones en el DNA, se desconoce cómo reemplazan a las

polimerasas replicativas. Un trabajo reciente sugiere que este intercambio puede estar mediado, en parte, por Def1, que en presencia de daño en el DNA promueve la ubiquitilación y degradación de Pol3, la subunidad catalítica de Pol δ , lo que puede facilitar el intercambio de polimerasas (Daraba *et al*, 2014). Además, la actividad de las TLS está mediada por diversos factores. Entre ellos, varios estudios han indicado un papel de Mec1/ATR en el control de su función (Gallego-Sanchez *et al*, 2013; Gohler *et al*, 2011; Hirano y Sugimoto, 2006; Pages *et al*, 2009). Del mismo modo, otras modificaciones post-transcripcionales de las polimerasas de TLS contribuyen a su regulación. Por ejemplo, la ubiquitilación de Pol η inhibe su interacción con PCNA y se encuentra reducida en presencia de daño en el DNA (Bienko *et al*, 2010; Jung *et al*, 2011).

A pesar de que la monoubiquitilación de PCNA es fundamental para promover TLS, la activación de este proceso parece ser mucho más compleja. Por ejemplo, la modificación de PCNA podría no ser esencial en células de mamífero (Hendel *et al*, 2011) y, en *S. cerevisiae*, parte de la función de Pol ζ es independiente de la ubiquitilación de PCNA (Stelter y Ulrich, 2003). Estos datos sugieren mecanismos alternativos para la tolerancia al daño en el DNA mediada por TLS, que serían dependientes de una función no catalítica de REV1 (Edmunds *et al*, 2008). Por otra parte, se ha propuesto que la Pol η humana tiene un papel inesperado, separable de su función catalítica, en el reclutamiento de Rad18 y la ubiquitilación de PCNA en respuesta al daño en el DNA (Durando *et al*, 2013). Este estudio pone en cuestión la idea de TLS como una ruta lineal en la que Rad18 promueve la actividad de las TLS por la ubiquitilación de PCNA, sugiriendo una interdependencia en los papeles de Rad18 y Pol η en la activación de TLS.

Algunos de los últimos avances en el modo de acción de la síntesis a través de lesiones proceden de la identificación de diversas proteínas que pueden actuar como reguladores de la monoubiquitilación de PCNA y de TLS (Figura I4), especialmente en mamíferos, donde la regulación del proceso es más compleja que en levaduras. Así, Spartan (C1orf124/DVC1) sería un regulador de las polimerasas de TLS en mamíferos, aunque tanto su mecanismo de acción como sus efectos son controvertidos (Centore *et al*, 2012; Davis *et al*, 2012; Ghosal *et al*, 2012; Juhasz *et al*, 2012; Mosbech *et al*, 2012). También se ha mostrado que NBS1 participa en la regulación de TLS: esta proteína se une a RAD18 tras exposición con luz UV y participa en su reclutamiento a los sitios de daño. Además, NBS1 tiene un papel directo en la síntesis a través de lesiones dependiente de Pol η (Yanagihara *et al*, 2011). Otro posible regulador de TLS es PAF15, que en una fase S normal está ubiquitilado y se une a PCNA, inhibiendo el reclutamiento de Pol η (Povlsen *et al*, 2012). Cuando existen perturbaciones en la replicación, esta proteína se separa de PCNA, lo que facilitaría el baipás de las lesiones al permitir la unión de Pol η (Povlsen *et al*, 2012). Diversos estudios proponen que los remodeladores

de cromatina también son importantes en la activación de TLS. Así, el complejo remodelador de cromatina de levadura INO80 facilita el reclutamiento de Rad18 a las horquillas bloqueadas y por consiguiente la monoubiquitilación de PCNA y la síntesis a través de lesiones (Falbo *et al*, 2009). Del mismo modo, el complejo remodelador RSC juega un papel en la monoubiquitilación de PCNA en *S. cerevisiae* (Niimi *et al*, 2012). Recientemente se ha encontrado que el represor transcripcional ZBTB1, que tiene un dominio de unión a ubiquitina UBZ4, también actúa en la regulación de TLS en mamíferos en respuesta al daño en el DNA producido por luz UV (Kim *et al*, 2014). ZBTB1 es necesario para la localización de fosfo-KAP1 a la cromatina, lo que permite la relajación de la misma en condiciones de daño en el DNA, facilitando el reclutamiento de Rad18 y, por tanto, la monoubiquitilación de Rad18 y el proceso de TLS (Kim *et al*, 2014).

4.3. Rama libre de error dependiente de Rad5 de tolerancia al daño en el DNA

La segunda rama de la ruta *RAD6/RAD18*, dependiente de Rad5, se desencadena con la poliubiquitilación de PCNA en la lisina 164, y permite la tolerancia al daño en el DNA mediante un mecanismo libre de errores (Figuras I3). Aunque este proceso no se comprende por completo molecularmente, se postula que esta vía evita la lesión mediante un cambio temporal de cadenas molde, en el que la cadena bloqueada utiliza la hebra no dañada de la cromátida hermana, recién sintetizada, como molde para replicar la región dañada (Zhang y Lawrence, 2005). En principio se propuso que este modo de tolerancia de las lesiones ocurría por reversión de las horquillas de replicación (Higgins *et al*, 1976) y, más tarde, se sugirió que este mecanismo podría implicar la invasión de la cromátida hermana por la cadena naciente bloqueada, en un proceso similar a la recombinación homóloga (Zhang y Lawrence, 2005).

Rad5 (Figura I5), la E3 ubiquitina-ligasa responsable de la poliubiquitilación de PCNA en *S. cerevisiae*, contiene un dominio helicasa formado por los 7 motivos característicos de la superfamilia SWI/SNF2 de ATPasas dependientes de DNA (Johnson *et al*, 1992), en el cual se encuentra embebido un motivo *RING finger* responsable de su actividad E3 y de la interacción con su enzima conjugadora E2 correspondiente. Además, Rad5 contiene un dominio HIRAN que podría facilitar el reconocimiento del DNA dañado o de las horquillas de replicación bloqueadas y la unión a la cromatina (Iyer *et al*, 2006).

La actividad ATPasa dependiente de DNA de Rad5 es necesaria para su función en la tolerancia al daño en el DNA (Gangavarapu *et al*, 2006) y está ligada a su actividad como helicasa de DNA, la cual promueve la regresión de horquillas de replicación *in vitro* (Blastyak *et al*, 2007) (Figura I6). Del mismo modo, su proteína homóloga HLTF también es capaz de catalizar *in vitro* la regresión de horquillas de replicación sintéticas (Blastyak *et al*, 2010).

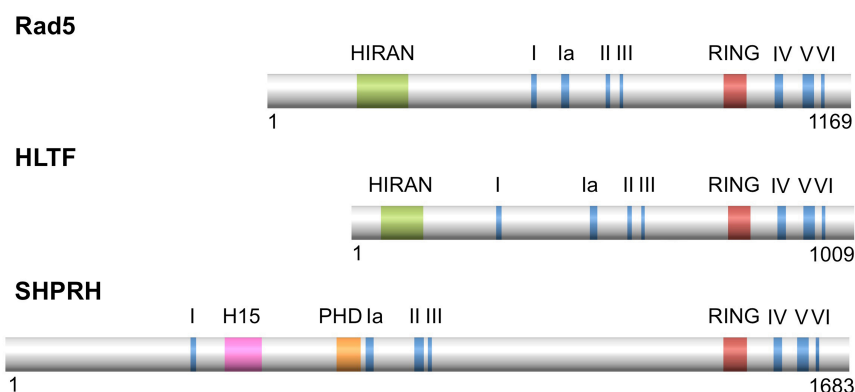


Figura I5. Estructura de Rad5 y de sus homólogas funcionales en humanos, HLTF y SHPRH. Las tres proteínas muestran una organización conservada de sus dominios funcionales, con el dominio RING *finger* -en rojo- de tipo C₃HC₄ embebido en el dominio helicasa. Los siete motivos que forman el dominio helicasa se muestran en azul nombrados con números romanos. Rad5 y HLTF contienen además un dominio HIRAN -en verde- en su extremo N terminal, mientras que SHPRH muestra un dominio H15 -en rosa-, que media la interacción con Rad18 (Zeman *et al*, 2014), así como un dominio C₄HC₃ PHD, similar al dominio RING *finger* -en naranja-.

El intermediario que se forma puede resolverse por una nueva reversión de la horquilla de replicación que permita el reanillamiento de las cadenas parentales con sus correspondientes cadenas hijas y la continuación de la replicación. Sin embargo, aún se desconoce si la regresión de horquillas mediada por Rad5^{HLTF} para permitir la tolerancia de las lesiones en el DNA ocurre *in vivo*. Por otra parte, bajo condiciones de daño en el DNA, se ha mostrado mediante electroforesis bidimensional la existencia de estructuras con forma de X que implican uniones de cromátidas hermanas (SCJs) (Branzei *et al*, 2008; Liberi *et al*, 2005; Minca y Kowalski, 2010), lo cual encaja con el modelo de cambio de molde para el baipás de las lesiones en el DNA. En este caso ocurriría un mecanismo de invasión de hebra que permite usar la secuencia homóloga de la cromátida hermana como molde, formando un D-loop que tras la síntesis de DNA debe resolverse, volviéndose a asociar el nuevo fragmento a la cadena molde con la lesión (Figura I6). La formación de estas SCJs inducidas por daño dependen de Rad5 y Rad18, y en el proceso podrían participar distintos componentes de la maquinaria de HR como Rad51 o Rad52, probablemente reclutados por el complejo Shu; además requiere síntesis de DNA dependiente de Pol δ pero no las polimerasas de TLS (Ball *et al*, 2009; Branzei *et al*, 2008; Gangavarapu *et al*, 2007; Liberi *et al*, 2005; Minca y Kowalski, 2010; Vanoli *et al*, 2010). Este proceso se encuentra favorecido por la sumoilación de PCNA (Branzei *et al*, 2008). Finalmente, las SCJs se resuelven normalmente por el complejo Sgs1/Top3/Rmi1 (Branzei *et al*, 2008; Liberi *et al*, 2005).

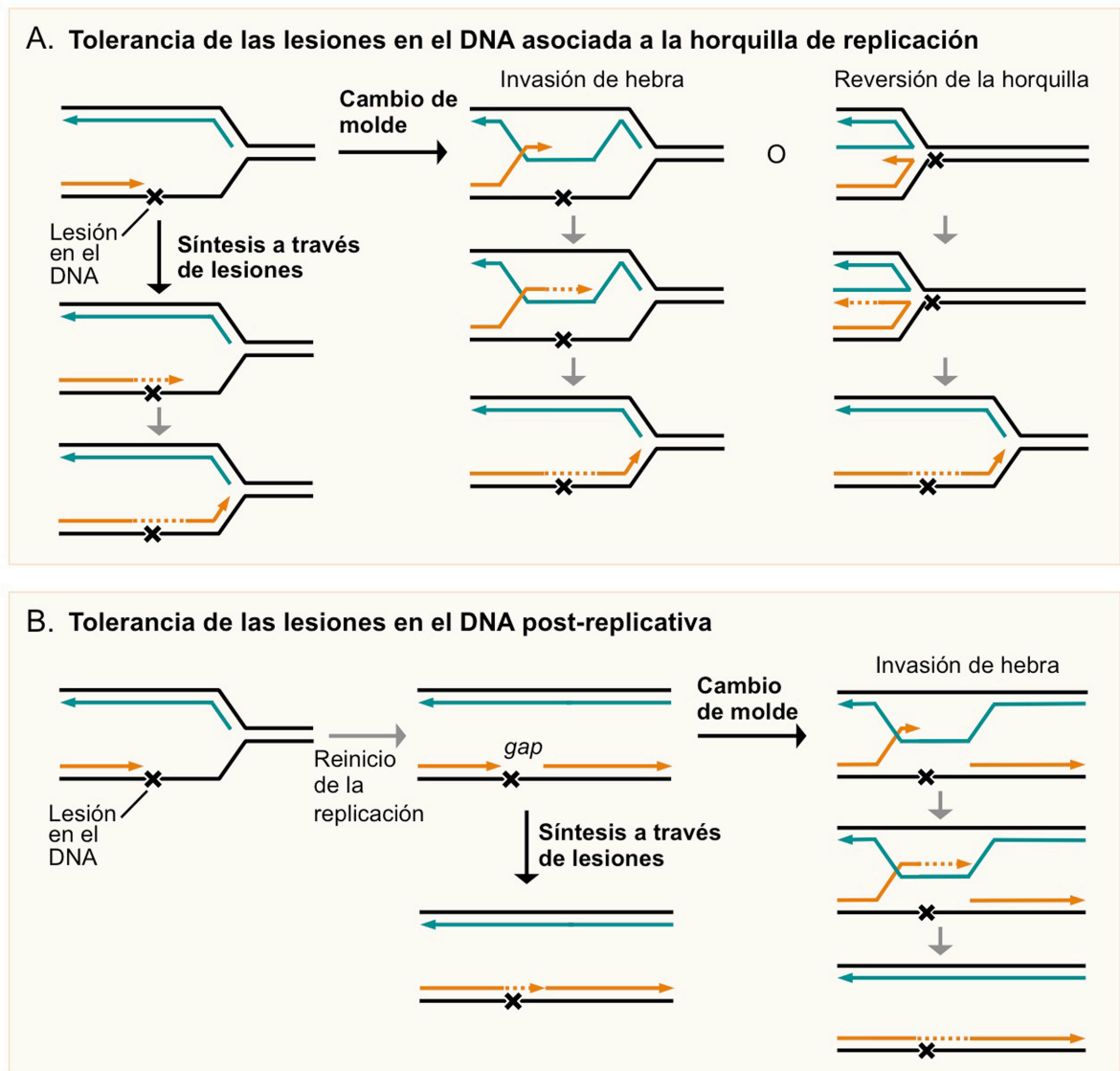


Figura I6. Esquema de los posibles modos de actuación de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA mediados por la ruta *RAD6/RAD18*. El baipás de las lesiones no reparadas (representadas por una X) que originan bloqueos de las horquillas de replicación puede llevarse a cabo por TLS o por intercambio de cadenas molde, los cuales, en principio, pueden tener lugar asociados a la horquilla de replicación (A), o de forma post-replicativa (B). En el segundo caso, los mecanismos de tolerancia a las lesiones rellenan huecos dejados en la cadena hija como consecuencia de un reinicio de las horquillas de replicación tras la lesión en el DNA. TLS se lleva a cabo por polimerasas especializadas capaces de replicar a través de las lesiones. Durante el mecanismo de cambio de molde, la cadena naciente bloqueada usa temporalmente la cadena recién sintetizada, no dañada, de la cromátida hermana como molde para replicar la zona que contiene la lesión. El intercambio de molde requiere la invasión del dúplex de DNA homólogo por la hebra naciente bloqueada, lo que da lugar a un intermediario de recombinación. En el baipás de las lesiones asociado a las horquillas de replicación, el intercambio de molde podría ocurrir además por regresión de la horquilla de replicación bloqueada y su posterior reversión una vez que se ha sintetizado el DNA complementario al del sitio de la lesión. Por simplificación, el esquema muestra únicamente lesiones en la cadena líder del DNA. Las lesiones en la cadena retrasada probablemente den lugar a huecos en la cadena hija debidos a fragmentos de Okazaki que no pueden completarse y que podrían rellenarse post-replicativamente.

La poliubiquitilación de PCNA se ha ligado firmemente al intercambio de molde (Figura 17) (Hoege *et al*, 2002), pero el mecanismo por el que esta modificación da lugar al intercambio de cadenas es todavía especulativo. Una posibilidad es que como consecuencia directa de la poliubiquitilación de PCNA se desplacen las polimerasas de TLS, lo que facilitaría el acceso y posterior función de las proteínas involucradas en el proceso de intercambio de molde. Otra posibilidad es que PCNA poliubiquitilado actúe como plataforma de unión que permita el reclutamiento de proteínas necesarias para el mecanismo de tolerancia al daño en el DNA dependiente de Rad5. Con respecto a esta segunda posibilidad, se han encontrado proteínas con afinidad por PCNA poliubiquitilado (Figura 17), como Mgs1, una AAA+ATPasa que interacciona con PCNA modificado a través de su dominio de UBZ tanto *in vivo* como *in vitro* (Saugar *et al*, 2012). Mgs1 es esencial en ausencia de la ruta *RAD6/RAD18* y contribuye a la estabilidad del genoma. Esta proteína interacciona preferentemente con PCNA poliubiquitilado lo que permite su reclutamiento a la cromatina cuando las horquillas de replicación están detenidas (Saugar *et al*, 2012). WRNIP1, homóloga de Mgs1 en mamíferos, se recluta a focos asociados a RPA en un proceso que depende del dominio UBZ (Crosetto *et al*, 2008). Otra ATPasa que reconoce PCNA poliubiquitilado es ZRANB3 (también conocida como AH2) (Ciccina *et al*, 2012; Weston *et al*, 2012; Yuan *et al*, 2012). Curiosamente, ZRANB3/AH2 y WRNIP1 colocalizan en focos y coinmunoprecipitan (Ciccina *et al*, 2012). ZRANB3/AH2 reconoce PCNA poliubiquitilado a través de sus motivos PIP y NZF. Además, esta proteína muestra actividad endonucleasa, con preferencia por sustratos de DNA ramificados, así como una actividad helicasa que promueve el reanillamiento del DNA y la regresión de las horquillas de replicación (Ciccina *et al*, 2012; Weston *et al*, 2012; Yuan *et al*, 2012). La carencia de ZRANB3/AH2 da lugar a la acumulación de intercambios de cromátidas hermanas y de defectos en el reinicio de la replicación desde las horquillas detenidas en respuesta al daño en el DNA, lo que sugiere de que dicha proteína juega una función en la rama libre de error de tolerancia al daño en el DNA, quizá participando en el intercambio de cadenas en células de mamíferos (Ciccina *et al*, 2012; Weston *et al*, 2012; Yuan *et al*, 2012).

Además, estudios realizados en levaduras para identificar factores que actúan junto a PCNA poliubiquitilado han mostrado que el complejo 9-1-1 participa, junto con Exo1, en la rama dependiente de Rad5 de tolerancia al daño en el DNA (Karras *et al*, 2013). Se ha mostrado que el complejo 9-1-1 podría promover el intercambio de molde de manera independiente de su función de *checkpoint*, de una forma post-replicativa, y que el papel de Exo1 en esta ruta sería expandir los *gaps* de DNA de cadena sencilla, facilitando la acción de los factores de recombinación homóloga (Karras *et al*, 2013). Además de promover la ruta dependiente de Rad5, el complejo 9-1-1 podría suprimir TLS bajo condiciones de daño crónico en el DNA (Murakami-Sekimata *et al*, 2010).

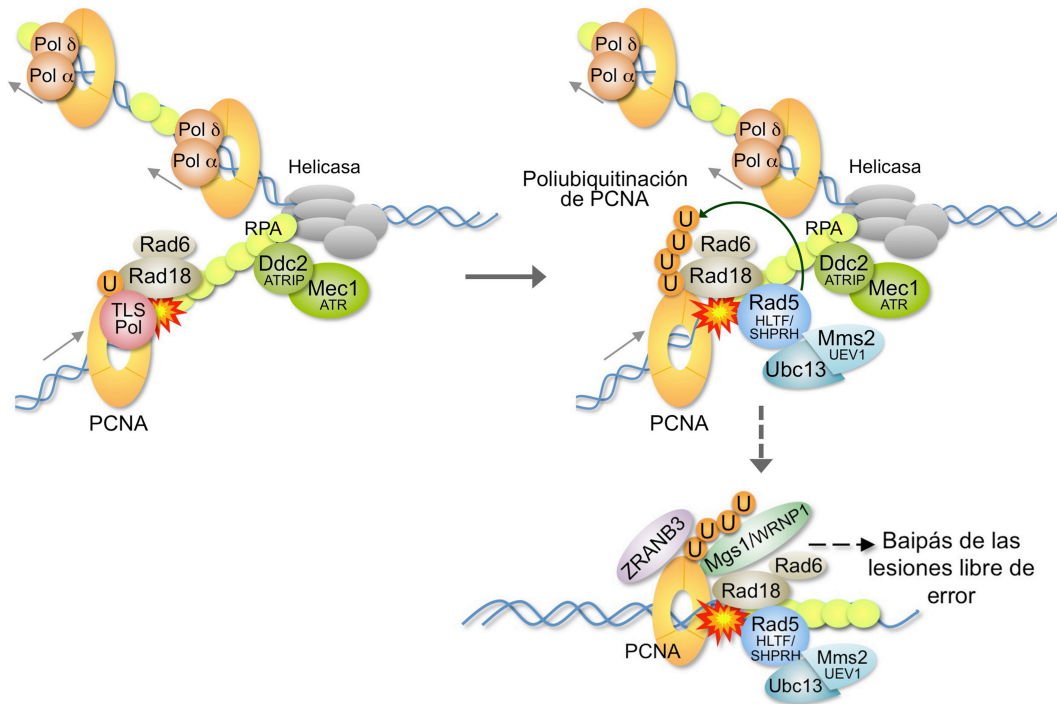


Figura 17. Activación y modulación de la rama de tolerancia al daño en el DNA dependiente de Rad5.

PCNA monoubiquitilado puede ser poliubiquitilado por Rad5^{HLTF/SHPRH} junto con Ubc13-Mms2^{UEV1}. La poliubiquitinación de PCNA da lugar a la actuación de la rama libre de error dependiente de Rad5. En el panel inferior se muestran diversas proteínas que se unen a PCNA poliubiquitilado, probablemente modulando este mecanismo de baipás de las lesiones.

Una característica interesante de la rama libre de error de la ruta *RAD6/RAD18* en mamíferos es la existencia de dos homólogas funcionales de Rad5 capaces de poliubiquitilar PCNA: SHPRH y HLTF (Motegi *et al*, 2008; Motegi *et al*, 2006; Unk *et al*, 2010; Unk *et al*, 2008; Unk *et al*, 2006). En ausencia de cualquiera de ellas aumenta la frecuencia de anomalías cromosómicas así como de mutaciones puntuales en condiciones de daño en el DNA (Lin *et al*, 2011; Motegi *et al*, 2008; Motegi *et al*, 2006). Aunque ambas pueden poliubiquitilar PCNA, sus funciones no son redundantes, sino que promueven respuestas específicas para distintos tipos de lesiones. Así, en respuesta a la irradiación con luz UV, HLTF promueve la monoubiquitinación de PCNA y el reclutamiento de Pol η , a la vez que suprime la acción de SHPRH. Por el contrario, cuando las células se tratan con MMS, HLTF se degrada y SHPRH recluta Pol κ (Lin *et al*, 2011). Estos datos indican que HLTF y SHPRH no solo promueven la rama libre de error de tolerancia al daño en el DNA y son capaces de diferenciar entre distintos tipos de daño, sino que además coordinan en parte la interacción entre la rama dependiente de Rad5 y la de TLS. Del mismo modo, Rad5 también participa en la regulación de TLS de forma independiente de sus actividades ubiquitina-ligasa o helicasa, probablemente mediante un papel estructural (Coulon *et al*, 2010; Gangavarapu *et al*, 2006; Halas *et al*, 2011;

Kuang *et al*, 2013; Pages *et al*, 2008; Sale, 2013). Estos datos muestran la existencia de interconexiones funcionales entre las dos ramas de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA.

4.4. Balance entre los mecanismos de síntesis a través de lesiones y cambio de molde para el baipás del daño en el DNA

Una cuestión importante por resolver es establecer cuáles son los mecanismos que regulan la elección entre las distintas estrategias de tolerancia de las lesiones en el DNA. Esta elección puede determinar que el resultado del proceso sea libre de error o mutagénico, por lo que es necesaria la existencia de un balance adecuado entre los dos modos de DDT. Por el momento no se conoce qué causa el paso de monoubiquitilación a poliubiquitilación de PCNA y por tanto de TLS al mecanismo de cambio de molde. Rad5 y Rad18 interaccionan físicamente (Ulrich y Jentsch, 2000), lo que debería ser fundamental para desencadenar la transición del estado mono- a poliubiquitado de PCNA. Sin embargo, se sabe poco acerca de las condiciones que promueven la interacción entre Rad5 y Rad18, así como con el complejo E2 conjugador de ubiquitina Ubc13-Mms2.

Como la síntesis a través de lesiones es frecuentemente mutagénica, cabría esperar que el mecanismo libre de error constituyese la primera elección para la tolerancia de las lesiones en el DNA. Sin embargo, este no es siempre el caso. De hecho, a pesar de su naturaleza mutagénica, TLS es importante en la defensa de las células frente al daño en el DNA, lo que indica que funciona en la célula de forma habitual. En células de mamífero, la poliubiquitilación de PCNA se detecta en menores niveles que en levaduras (Kannouche *et al*, 2004), pero se desconoce si esto implica que el mecanismo de cambio de molde es en general menos importante para la tolerancia al daño en el DNA en eucariotas superiores. Esta idea se vería apoyada por un estudio que muestra que, en células humanas, las lesiones en el DNA causadas por agentes ambientales como el humo del tabaco o la luz UV se toleran preferentemente mediante TLS, si bien una lesión artificial causada por introducción de un trimetileno se tolera preferentemente por intercambio de cadena molde (Izhar *et al*, 2013). En *S. cerevisiae*, el daño causado por la exposición aguda a luz UV se tolera mayoritariamente por TLS (Daigaku *et al*, 2010). Sin embargo, la ruta libre de error dependiente de Rad5 es más importante en el caso de una exposición crónica a luz UV a baja dosis (Hishida *et al*, 2009). En levaduras, ambas ramas de la ruta de DDT son suficientes para hacer frente a dosis muy bajas de MMS, pero el uso preferente de una u otra depende en este caso de la fase del ciclo celular (Huang *et al*, 2013). Los ejemplos anteriores muestran que no está claro qué determina la prevalencia de una u otra rama de la ruta *RAD6/RAD18* cuando las células hacen frente al daño en el DNA. Diversos factores parecen participar en esta elección,

incluyendo el tipo de lesión, el alcance del daño y el momento del ciclo celular. También es posible que tanto TLS como la vía libre de error actúen simultáneamente en la célula para responder al mismo tipo de lesiones en el DNA, y quizá la elección entre una u otra debería considerarse teniendo en cuenta una región cromosómica local y no la célula en su conjunto. De hecho, un estudio reciente ha mostrado que la torsión del DNA, mediada por Hmo1 en *S. cerevisiae*, dirige las lesiones hacia la vía libre de error dependiente de Rad5 (Gonzalez-Huici *et al*, 2014). Esto revela que los cambios topológicos tienen una importante influencia en el modo de tolerar las lesiones en el DNA.

4.5. Dónde y cuándo actúan los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA

Un debate por resolver es si la tolerancia al daño en el DNA tiene lugar acoplada a las horquillas de replicación o de una forma post-replicativa (Figura I6) (Ulrich, 2011). Aunque inicialmente DDT se consideró un proceso de reparación post-replicativo, la idea más extendida posteriormente es que el baipás de las lesiones en el DNA ocurría directamente en las horquillas de replicación. Sin embargo, diversos estudios llevados a cabo en levaduras apoyan la idea de que ambas ramas de la ruta *RAD6/RAD18* actúan detrás de las horquillas de replicación, seguramente promoviendo el relleno de los huecos o *gaps* que podrían dejarse en la hebra naciente (Branzei *et al*, 2008; Daigaku *et al*, 2010; Diamant *et al*, 2012; Huang *et al*, 2013; Karras y Jentsch, 2010; Lopes *et al*, 2006). Es más, aun cuando los procesos de DDT se inician durante la fase S, los mecanismos de TLS y de intercambio de molde pueden funcionar después de la replicación de la mayor parte del genoma (Daigaku *et al*, 2010; Karras y Jentsch, 2010). Por otra parte, Rev1 está regulada en el ciclo celular y tiene un pico de expresión en G2 (Waters y Walker, 2006). Estos datos apoyan que la tolerancia al daño en el material genético ocurre post-replicativamente, especialmente en el caso de TLS. Sin embargo, otros estudios aportan argumentos a favor del mecanismo de intercambio de molde acoplado a las horquillas de replicación. Así, en *S. cerevisiae*, la rama de DDT dependiente de Rad5 podría facilitar el reinicio de la replicación desde horquillas de replicación bloqueadas, al menos cerca de orígenes de replicación (Minca y Kowalski, 2010). Además, dado que tanto Rad5 como HLTf, promueven *in vitro* la regresión de horquillas de replicación (Blastyak *et al*, 2010; Blastyak *et al*, 2007), existe la posibilidad de que este mecanismo también ocurra *in vivo*. Es probable que la tolerancia de las lesiones mediada por Rad5^{HLTf/SHPRH} pueda ocurrir tanto acoplada a las horquillas de replicación como post-replicativamente, y el cambio de molde podría explicarse en ambos casos por el mismo mecanismo similar al de HR en el que se formarían SCJs (Branzei *et al*, 2008). Además, en el primero de los casos, también sería posible que ocurriese por regresión de las horquillas de replicación (Figura I6).

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es contribuir al conocimiento de los procesos que las células eucarióticas utilizan para tolerar las lesiones en el DNA durante la replicación cromosómica, haciendo posible la estabilidad del genoma.

Los objetivos específicos son:

1. Analizar la contribución de cada una de las ramas de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA de *Saccharomyces cerevisiae* al mantenimiento de la estabilidad genómica durante la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el material genético.
2. Estudiar la función y regulación de los componentes de la ruta *RAD6/RAD18* que muestren un papel más relevante en esta respuesta celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Todas las cepas de levadura utilizadas en este trabajo derivan de W303, si bien tienen corregida la mutación del gen *RAD5* en el aminoácido 535 que portaba la cepa original. Sus genotipos se recogen en la Tabla M1.

Nombre	Genotipo	Origen
SY2080	HKY579-10A <i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	Marco Foiani (IFOM, Milan)
SY2214	HKY578-2C <i>MATa rad5Δ::URA3 ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	Marco Foiani (IFOM, Milan)
YM07	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 RAD5+ rev3Δ::kanMX</i>	Esta tesis
YM010	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 RAD5+ rad30Δ::kanMX</i>	Esta tesis
YM013	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 RAD5+</i>	Esta tesis
YM015	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 RAD5+ rev3Δ::kanMX rev1Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YM016	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 RAD5+ rev3Δ::kanMX rad30Δ::URA3</i>	Esta tesis
YM018	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 rad5Δ::URA3</i>	Esta tesis
YM020	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 rev1Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YM027	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 RAD5+ rev3Δ::kanMX rev1Δ::LEU2 rad30Δ::URA3</i>	Esta tesis
YM028	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 rad5Δ::URA3 rev3Δ::kanMX rev1Δ::LEU2 rad30Δ::URA3</i>	Esta tesis
YM029	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 ubc13Δ::natNT2</i>	Esta tesis
YM030	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ubc13Δ::natNT2</i>	Esta tesis
YM036	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-yeGFP-RAD5::natNT2</i>	Esta tesis
YM037	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 RAD5-GFP::HISMx6</i>	Esta tesis
YM043	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 DDC2-GFP::HISMx6</i>	Esta tesis
YM044	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 DDC2-GFP::HISMx6 rad5Δ::URA3</i>	Esta tesis
YM045	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-yeGFP-RAD5::natNT2 sml1Δ::URA3 rad53Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YM047	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-yeGFP-RAD5::natNT2 sml1Δ::URA3</i>	Esta tesis
YM051	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-yeGFP-RAD5::natNT2 rad18Δ::LEU2</i>	Esta tesis
YM052	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 RAD5-3HA::TRP1</i>	Esta tesis
YM054	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1</i>	Esta tesis

YM055	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211::URA3</i>	Esta tesis
YM056	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-RAD5::URA3</i>	Esta tesis
YM057	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A)::URA3</i>	Esta tesis
YM060	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(I916A)::URA3</i>	Esta tesis
YM063	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A)::URA3</i>	Esta tesis
YM064	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-RAD5::URA3 -13Myc::KanMX</i>	Esta tesis
YM065	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A)::URA3-13Myc::KanMX</i>	Esta tesis
YM067	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1, ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A,I916A)::URA3-13Myc::KanMX</i>	Esta tesis
YM069	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1 ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-RAD5::URA3 ubc13Δ::natNT2</i>	Esta tesis
YM071	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad5Δ::TRP1 ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A)::URA3 ubc13Δ::natNT2</i>	Esta tesis
YM077	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{GALS}::natNT2-RAD5-GFP::HISMx6</i>	Esta tesis
YM092	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A)::URA3</i>	Esta tesis
YM093	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ARS608Δ::HIS3 ARS609Δ::TRP1 ura3-1::Ylp211-P_{RAD5}-rad5(I916A)::URA3</i>	Esta tesis
YM095	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ura3-1::URA3::Ylp211-P_{ADH1}-yeGFP-RAD5::natNT2</i>	Esta tesis
YM096	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ura3-1::URA3::Ylp211-P_{ADH1}-yeGFP-rad5(K538A,T539A)::natNT2</i>	Esta tesis
YM097	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ura3-1::URA3::Ylp211-P_{ADH1}-yeGFP-rad5(I916A)::natNT2</i>	Esta tesis
YM098	<i>MATa ade2-1::ADE2 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 ura3-1::URA3::Ylp211-P_{ADH1}-yeGFP-rad5(K538A,T539A,I916A)::natNT2</i>	Esta tesis
YJT116	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 rad18Δ::kanMX</i>	Esta tesis
YMG19	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100 P_{ADH1}-yeGFP-RAD5::natNT2 sml1Δ::URA3 mec1Δ::LEU2</i>	Esta tesis

Tabla M1. Lista de las cepas de levadura utilizadas en esta tesis y detalle de sus genotipos.

1.2. Cepas de *Escherichia coli*

En este trabajo se utilizaron las estirpes DH5- α : F⁻, (ϕ 80*lacZ*Δ*M15*), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (*r*_K⁻,*m*_K⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)*U169* (Hanahan, 1985) y JM110: *rpsL* (Str^r), *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *aara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, Δ(*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacI*^qΔ*M15*] (Yanisch-Perron et al., 1985).

1.3. Plásmidos

Se utilizaron los plásmidos de las series pRS, pML, pFA6a y Ylp211 que aparecen listados en la Tabla M2.

Nombre	Genotipo	Origen
pRS303	pBluescript (KS+)- <i>HIS3</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS304	pBluescript (KS+)- <i>TRP1</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS305	pBluescript (KS+)- <i>LEU2</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS306	pBluescript (KS+)- <i>URA3</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pUG6	loxP- <i>kanMX</i> -loxP (Derivado de pFA6- <i>kanMX4</i>)	(Güldener <i>et al</i> , 1996)
pML6	pFA6a- <i>GFP(s65T)-His3MX6</i>	(Longtine <i>et al</i> , 1998)
pML8	pFA6a- <i>3HA-TRP1</i>	(Longtine <i>et al</i> , 1998)
pML9	pFA6a- <i>3HA-His3MX6</i>	(Longtine <i>et al</i> , 1998)
pML10	pFA6a- <i>13Myc-kanMX</i>	(Longtine <i>et al</i> , 1998)
pFA6a- <i>natNT2</i>	pFA6a- <i>natNT2</i>	(Longtine <i>et al</i> , 1998)
pYM-N9	pFA6a- <i>P_{ADH1}-yeGFP-NatNT2</i>	(Janke <i>et al</i> , 2004)
pYM-N31	pFA6a- <i>P_{GALS}-NatNT2</i>	(Janke <i>et al</i> , 2004)
YIp211	YIp211- <i>URA3</i>	Helle Ulrich (IMB, Mainz)
YIp211- <i>P_{RAD5}-RAD5</i>	YIp211- <i>P_{RAD5}-RAD5-URA3</i>	Helle Ulrich (IMB, Mainz)
YIp211- <i>P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A)</i>	YIp211- <i>P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A)-URA3</i>	Helle Ulrich (IMB, Mainz)
YIp211- <i>P_{RAD5}-rad5(I916A)</i>	YIp211- <i>P_{RAD5}-rad5(I916A)-URA3</i>	Helle Ulrich (IMB, Mainz)
YIp211- <i>P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A,I916A)</i>	YIp211- <i>P_{RAD5}-rad5(K538A,T539A,I916A)-URA3</i>	Esta tesis

Tabla M2. Lista de los plásmidos utilizados en esta tesis.

1.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados durante esta tesis fueron sintetizados por Invitrogen, y se describen en la tabla 4.

Nombre	Secuencia
Kan FW	5' CCTCGACATCATCTGCCC3'
Kan RE	5' GGATGTATGGGCTAAATG3'
His FW	5' GAATGATCATCACCGTAGTG3'
His RE	5' CGTTTATCTTGCCCTGCTCAT3'
Leu FW	5' CATCGAATTTGATTCTGTGC3'
Leu RE	5' GTAAAGGAATACAGGTAAGC3'
Trp FW	5' CAGTGCAGCTTCACAGAAAC3'
Trp RE	5' CCGCAAACCTTTCACCAATGG3'

Ura FW	5' GACATGGGTGGAAGAGATGA3'
Ura RE	5' GAACATCCAATGAAGCACAC3'
Nat-1	5' CTAATCTCGAGGCGAATTTTC3'
Nat-2	5' CGTCAAGAGTGGTACCCATG3'
5'-ARS607	5' GGTCACCAACAAGACGGAGG3'
3'-ARS607	5' TGTGATACTGATTCTCTCGT3'
Oligo VI-2.1	5' CTATCACTCGATGGTGCAAC3'
Oligo VI-2.2	5' GTGGAGAGTGAAGATGACGA3'
Oligo VI-3.1	5' CCTGAATGGTCTCAATTTGT3'
Oligo VI-3.3	5' GACTAGTCGAATATGGGTTT3'
Oligo VI-5.7	5' GCAAGTAAGCAGCCATCGTC3'
Oligo VI-5.8	5' GCAAGTTCTCGGTTCCCTTG3'
Oligo VI-6.5	5' GATCCATTATTTGCAGCGGT3'
Oligo VI-6.6	5' GCGTTACCGATTAATGACAC3'
Oligo ARS609-1	5' TTTTGTGGATCCCCTTCCCATAAAGAATCCAAACGG3'
Oligo ARS609-2	5' TTTTCTCTCGAGGGGTATCTTCTGTGAGTAACTAACG3'
5'-del.rad5	5' TACAAAGTTACATTATCAAAAGGCCTTAGAAACACACCTAAAGTCTTACAG TATCACAATCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3'
3'-del.rad5	5' AGTTCTTTTCGGGTTGAAAATAATAATAAATAAAGTCTTTATATATGAGTAT GTGGTATGACGCATCTGTGCGGTATTTACACCG3'
5' test del rad5	5' GGTTTCTGATGTTCTAGATG3'
3' test del rad5	5' CAAACCAGCTTAATGTCGTG3'
RAD5-FW	5' GGTTGAGTATAGGTGATAGC3'
RAD5-RE	5' CTGAAGTGTCAAGGTCATCG3'
RAD5-L	5' GCAGCAGGACCATGTAAACG3'
RAD5-R	5' AAACCTCGTTACTCCACTGCG3'
5' RAD5 tag	5' TGAGGCCATGGACACAGACGAAGACGAGAGAAGAAAAAGGAGAATTGAAGA AATCCAGATGCTGTTTGAACGGATCCCCGGTTAATTAA3'
3' RAD5 tag	5' GAAAAGGAAGATAATAGAAGTTGCATGAAGTAGCTGAAGAATAATTAGTTC TTTCGGGTTGAAAATACTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC3'
5' Nter tag RAD5	5' AATTATCTACAAAGTTACATTATCAAAAGGCCTTAGAAACACACCTAAAGT CTTACAGTATCACAATATGCGTACGCTGCAGGTCGAC3'
3' Nter tag RAD5	5' TTAACGATGTTTCTGAAGTGTCAAGGTCATCGTTAAAAAACCTCTTCCTTT CTCCTGTTCAATATGACTCATCGATGAATTCTCTGTCG3'
5' DDC2 tag	5' CATTCGATCTAACCACACTAGAGGAGGCCGATTCAATTATATATCTCAATGG GACTGCGGATCCCCGGGTTAATTAA3'
3' DDC2 tag	5' ATTACAAGGTTTCTATAAAGCGTTGACATTTTCCCTTTTGATTGTTGCCT TAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC3'
5'-test del ddc2	5' CAGGCTCGCTCTTTCCTACT3'
3'-test del ddc2	5' CAAGGCAAAGAGAAGACACA3'
5'-del rev3/kan	5' AAGAGAAAGTATTTGAGTCAATACAAAACCTACAAGTTGTGGCGAAATAAAA TGTTTGAACAGCTGAAGCTTCGTACGC3'
3'-del rev3/kan	5' CGTTATACATAGAAACAAATAACTACTCATCATTTTGCAGACATATCTGT GTCTAGACATAGGCCACTAGTGGATCTG3'
5'-test del rev3	5' CACTCAAATTTGGGAGGA3'
3'-test del rev3	5' CCACCAGATAGAGTTTG3'
5'-del.ubc13-nat	5' GTTCTTTTTTTTTTCCAATATTAGCAAATAAGGTCAGGTTTCATTGTAACATA GTTAGAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC3'
3'-del.ubc13-nat	5' CAGCATAGTAATGATATATATTATATATTCAGTTGAGAAAACCTATACAG AAATGATCAATCGATGAATTCGAGCTCG3'
5'-test del ubc13	5' GCCGCGGAACAGAAAATAC3'
3'-test del ubc13	5' GACCCTCGAGCGGACTAATG3'
5'-del.rev1	5' TAACGAGTTGACAGATTTTCTCAAAATAAATCGATACTGCATTTCTAGGCA TATCCAGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3'

3'-del.rev1	5' GTAATAATCATGCAGATATTACAGGTAATGTTTCGCAAACTGCGTGTCTTACTGTATGCTGACGCATCTGTGCGGTATTTTCACACCG3'
5'-test del rev1	5' CTACGAACCTTGCTGATGTCC3'
3'-test del rev1	5' GTGAGGATGTTTCATAGGCGC3'
5'-del.rad30	5' TGTAGTCTTCTAGCGCAGGCCTGCTCATTGTTTGAACGGCTTTGATAAAACAAGACAAAGCCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGC3'
3'-del.rad30	5' AAGCAATATTATCAGGACGTTTTAGTTGCTGAAGCCATATAATTGTCTATTGGAATAGGCGCATCTGTGCGGTATTTTCACACCG3'
5'-del.rad30/kan	5' TGTAGTCTTCTAGCGCAGGCCTGCTCATTGTTTGAACGGCTTTGATAAAACAAGACAAAGCCAGCTGAAGCTTCGTACGC3'
3'-del.rad30/kan	5' GCAATATTATCAGGACGTTTTAGTTGCTGAAGCCATATAATTGTCTATTTGGAATAGGCATAGGCCACTAGTGGATCTG3'
5'-test del rad30	5' GGCATGATAGGATGTTGC3'
3'-test del rad30	5' TCTGTGAGTCATGTCTAC3'
RAD5-I916A-FW	5' ATGCAATTCTGGAACCCG3'
RAD5-I916A-RE	5' GCCAACAACCGACAAGCG3'
RAD5-FW-367	5' ATAATCAGAGAGAAATCC3'
RAD5-RE+742	5' GAGCAATGTCTTCCGAAA3'
Oligo GFP-FW-Aval	5' CTCTCCCCCGGATGTCTAAAGGTGAAGAA3'
5'tag Yanke RAD5	5' TGAGGCCATGGACACAGACGAAGACGAGAGAAGAAAAGGAGAATTGAAGAAATCCAGATGCTGTTTGAACGTACGCTGCAGGTCGAC3'
3'tag Yanke RAD5	5' AATAATTAGTTCTTTTCGGGTTGAAAATAATAATAAAATAAAGTCTTTATATATGAGTATGTGGTATGACTAATCGATGAATTCGAGCTCG3'
Oligo 3'-Ylp211-tag	5' TTATAACTTATTTAATAATAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCCCCGGAATTAGCTTGGCTGCAGCTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC3'
Oligo 3'-test Ylp211	5' GCACCCCGAGGCTTTACAC3'

Tabla M3. Lista de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

1.5. Medios de cultivo

Las células de levadura se crecieron de forma habitual a 30°C en medio rico YP (1% extracto de levadura, Becton Dickinson; 2% bacto peptona, Becton Dickinson) suplementado con glucosa al 2% (medio YPD). Cuando fue necesario, se crecieron en medio mínimo (YNB sin aminoácidos 0,67%, Becton Dickinson) suplementado con glucosa (Merck) al 2% y los aminoácidos requeridos (Sigma-Aldrich), a las siguientes concentraciones: adenina, uracilo, L-triptófano, y L-histidina a 0,04 mg/ml y L-leucina a 0,08 mg/ml. Para el medio sólido se añadió agar al 2% (Becton Dickinson).

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia, se añadió al medio mínimo el suplemento *Yeast Synthetic Drop-out*, sin His, Leu, Trp ni Ura (Sigma-Aldrich).

Para los experimentos de sustitución de isótopos de densidad se utilizó un medio mínimo compuesto por YNB (sin aminoácidos y sin sulfato amónico) 0,16% (Becton Dickinson), ácido succínico 1,1% (Sigma-Aldrich), NaOH 0,67% (Merck), suplementado con isótopos pesados: D-glucosa (U-¹³C₆) 0,1% y sulfato amónico (¹⁵N₂) 0,01% (Cambridge Isotope Laboratories), o ligeros: D-glucosa 2% (¹²C) y sulfato amónico 0,01% (¹⁴N) (Merck), así como los aminoácidos requeridos por cada estirpe.

La esporulación de diploides se llevó a cabo en medio rico de esporulación (RSM) (extracto de levadura 0,25%, acetato potásico CH_3COOK 0,15 M, D-glucosa 0,1%, agar 2% y H_2O), suplementado con una solución con los requerimientos auxotróficos, a una concentración final del 2,5% (solución stock: adenina 0,4%, uracilo 0,4%, L-histidina 0,2%, L-leucina 0,2%, L-lisina 0,2%, L-triptófano 0,2%, L-tirosina 0,08%, L-fenilalanina 1%, L-metionina 0,2% y L-arginina 0,2%; todos de Sigma-Aldrich).

Las selecciones con antibiótico se realizaron con geneticina 200 $\mu\text{g/ml}$ (Gibco) o nourseotricina 100 $\mu\text{g/ml}$ (Werner Bioagents). Para los experimentos de inducción con el promotor GAL, se suplementó el medio YP con glucosa al 0,1% o galactosa al 2%.

E. coli se creció en medio LB (bacto-triptona 1%, Difco; extracto de levadura 0,5%, Difco; NaCl 1%, Merck). La selección con antibiótico se realizó suplementando el medio con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich).

1.6. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis, así como su procedencia y diluciones de uso, se recogen en la Tabla M4.

Nombre	Tipo	Especie	Dilución de uso	Origen
12CA5 (anti-HA)	Monoclonal	Ratón	1:1000	CBMSO
9E10 (anti-Myc)	Monoclonal	Ratón	1:1000	Cancer Research UK
Anti-GFP	Monoclonal	Ratón	1:400 o 1:4000	Roche
Anti-Actina	Monoclonal	Ratón	1:20000	MP Biomedicals
JD148 (Anti-Rad53)	Policlonal	Conejo	1:1000	Cancer Research UK

Tabla M4. Lista de los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.

Los anticuerpos primarios de ratón se hibridaron con un anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina G de ratón acoplado a HRP (peroxidasa de rábano, Vector Laboratories) y el policlonal de conejo se hibridó con proteína A conjugada con HRP (GE Healthcare). Ambos se utilizaron a una dilución 1:10000.

1.7. Reactivos y enzimas

El metil metanosulfonato (MMS), la hidroxurea (HU) y el nocodazol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El factor α fue proporcionado por el servicio de síntesis de péptidos del CBMSO.

Para el aislamiento de DNA plasmídico y la purificación de productos de PCR o bandas de gel de agarosa, se utilizaron los kits “*Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system*” y “*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*” de Promega.

Las enzimas de restricción se obtuvieron de Roche, New England Biolabs (NEB) o Fermentas. Las DNA polimerasas empleadas fueron Vent (NEB), Ex Taq (Takara) y Go Taq (Promega). La RNasa A, la pepsina, la β -glucuronidasa y la liticase fueron adquiridas en Sigma-Aldrich. La proteinasa K y la enzima Klenow fueron proporcionadas por Roche. La zimoliasa-20T fue suministrada por Seikagaku.

Las soluciones de acrilamida 40% y bis-acrilamida 2% fueron suministradas por Bio-Rad. Los marcadores de peso molecular de proteínas por NEB. Las membranas para unión de DNA (Hybond XL) o proteínas (Hybond ECL o Hybond-P), así como las columnas de Sefarosa G50, se obtuvieron de GE Healthcare.

El resto de sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos se obtuvieron de Merck, Sigma-Aldrich o PRS-Panreac.

2. MÉTODOS

2.1. Cultivo y transformación de *E. coli*

La bacteria *E. coli* se creció rutinariamente a 37°C, en medio LB líquido o sólido, en general suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ para el mantenimiento de los plásmidos de interés. Para la transformación de *E. coli* se siguió el protocolo de Hanahan (1983), descrito a continuación: las células competentes (obtenidas del servicio de fermentación de CBMSO) se mezclan con el DNA y se mantienen en hielo durante 15 min. A continuación se someten a un choque térmico a 42°C durante 90 s, tras lo cual se enfrían en hielo, se resuspenden en 4 volúmenes de LB y se incuban a 37°C durante 45 min para permitir la expresión del gen de resistencia al antibiótico que porta el plásmido introducido. Finalmente, las células se recogen, se plaquean en medio selectivo (LB con ampicilina) y se incuban a 37°C durante la noche.

2.2. Cultivos celulares de *S. cerevisiae* y sincronización en el ciclo celular

Las células de levadura se crecieron de forma habitual a 30°C hasta fase exponencial. Para sincronizarlas en la fase G1 del ciclo celular se utilizó la feromona factor α , a 5-10 $\mu\text{g/ml}$. Para sincronizar las células en fase S temprana se usó hidroxiquina (HU) a 200 mM. Para bloquear las células en G2/M se utilizó nocodazol a 2-5 $\mu\text{g/ml}$. El crecimiento y sincronización de las células se monitorizó siempre por observación y recuento del número de células al microscopio óptico en cámaras de Neubauer.

2.3. Construcción de las cepas de levaduras

Todas las cepas utilizadas en esta tesis derivan de W303 (Thomas y Rothstein, 1989). Dado que la cepa W303 porta en origen una mutación en el gen *RAD5* (*rad5-G535R*), se utilizó una cepa W303 corregida para *RAD5* o, en el caso de cepas ya construidas, se corrigió en estas la mutación mediante cruzamientos genéticos. Los mutantes de delección se obtuvieron por sustitución génica. Para ello, se transformó la cepa correspondiente con un producto de PCR portador del gen marcador de selección, amplificado a partir de los plásmidos correspondientes con oligonucleótidos que portaban secuencias idénticas a las regiones flanqueantes del gen a deleccionar. En cada caso se delecionó la fase de lectura abierta (ORF) completa del gen. Se utilizó la misma estrategia para el etiquetado de proteínas o la sustitución de promotores: transformación de la cepa correspondiente con un producto de PCR con el fragmento de DNA de interés, flanqueado por las secuencias en las que debe producirse la integración en el cromosoma.

Para la transformación de levaduras con el DNA de interés, se utilizó el método de transformación de Schiestl y Gietz (1989), modificado posteriormente por Gietz *et al* (1992). En este método de transformación, se parte de 10^8 células de levadura en fase exponencial, crecidas en medio rico (YPD). Tras centrifugación de las muestras, las células se resuspenden en 50 μ l de acetato de litio [(AcLi)/TE 100 mM, pH 7,5 (TE: Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM)], se mezclan con 5 μ l de DNA de esperma de salmón (10 mg/ml), 5-10 μ l de DNA (1-2 μ g) y 300 μ l de AcLi/PEG (100 mM de AcLi pH 7.5, TE y 40% PEG 4000), y se incuban en agitación a 30°C durante 30 min. A continuación se añade DMSO al 10% y se realiza un choque térmico de 15 min a 42°C, seguido de una incubación de 2 min en hielo. A continuación, las células se recogen, se resuspenden en TE y se siembran en placas con medio de selección apropiado para el crecimiento de las células transformantes. En el caso de usar geneticina o nourseotricina como marcadores de selección, las células se resuspenden en 1 ml de YPD previamente a su siembra y se mantienen en agitación a 30°C durante 2,5-4 h, para permitir la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos.

Algunas de las cepas se obtuvieron por el cruce de dos estirpes haploides de tipo sexual opuesto (*MATa* y *MAT α*) con los caracteres a combinar, la esporulación del diploide obtenido y la posterior selección de las esporas. Para la obtención de los diploides se mezclan células de las dos estirpes a cruzar en una placa de medio rico (YPD) y se incuban a 24°C durante la noche. Se aíslan colonias y cuando es posible los diploides se seleccionan por marcadores. Cuando no puede realizarse esta selección por marcadores, los posibles diploides se identifican tras observación microscópica, eligiendo las colonias con las células de mayor tamaño. Los potenciales diploides se pasan a

medio RSM y tras 2-3 días de incubación a 30°C se observa su esporulación al microscopio. Las esporas se separan usando uno de los siguientes dos métodos: selección de esporas al azar o disección de tétradas. En el método de selección de esporas al azar, las ascas se resuspenden en H₂O y se tratan con β -glucuronidasa durante toda la noche a temperatura ambiente para separar las esporas. Tras comprobar por observación microscópica la digestión de las ascas, las esporas se centrifugan, se lavan con H₂O y se plaquean en medio rico. Posteriormente se replican en placas de selección. En el método de disección de tétradas, las ascas se tratan durante 15 min con zimoliasa para debilitar la membrana que las rodea. A continuación se pone una gota de la suspensión celular en una placa de YPD, y con un micromanipulador se diseccionan las tétradas y se aíslan las cuatro esporas, las cuales se disponen en posiciones conocidas de una placa, donde se dejan germinar a 30°C durante 2-3 días. A continuación se replica esta placa en medio de selección apropiado, lo que permite observar la correcta segregación de los marcadores y la posterior selección de los haploides de interés.

Las cepas construidas se comprobaron en primer lugar por PCR, analizando la correcta inserción del DNA de interés en el *locus* deseado. Para ello se utilizaron parejas de oligonucleótidos que hibridaban en el DNA exógeno y en las regiones del genoma que lo flanquean. Se comprobó, cuando fue posible, el fenotipo de los distintos mutantes: morfología, sensibilidad a distintos compuestos o a temperatura, etc. En el caso de las proteínas etiquetadas, se comprobó por inmunoblot la correcta expresión de la proteína de fusión.

2.4. Citometría de flujo

Para el seguimiento de la progresión en el ciclo celular por citometría de flujo, se utilizó básicamente el método descrito por Labib *et al* (1999). Se toman muestras de 0,5-1 ml de cultivo, se centrifugan y las células se fijan en etanol 70% y se conservan a 4°C. Para su análisis por citometría de flujo, se transfieren 50-200 μ l de las células fijadas en etanol a 3 ml de citrato sódico 50 mM, para su rehidratación, y se centrifugan a 3000 rpm durante 3 min. A continuación, se resuspenden en 0,5 ml de citrato sódico 50 mM con RNasa A 0,1 mg/ml y se incuban a 37°C durante 2-4 h. Tras ello, se centrifugan de nuevo a 3000 rpm durante 3 min y se incuban durante 30 min a 37°C en una solución de HCl 50 mM con 5 mg/ml de pepsina. Finalmente, las células se centrifugan de nuevo 3 min a 3000 rpm y se resuspenden en 1 ml de citrato sódico 50 mM con ioduro de propidio 2 μ g/ml (Sigma-Aldrich), para la tinción del DNA. Antes de su paso por el citómetro, las muestras se sonicán para deshacer cualquier agregado. Las muestras se analizaron en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences), utilizando el programa CellQuestPro.

2.5. Ensayos de sensibilidad al tratamiento con MMS

La viabilidad de las células tras el tratamiento con MMS en una fase S se determinó mediante la siembra por triplicado en placas de YPD de aproximadamente 500 células, procedentes de cultivo líquido, y el recuento, tras tres días de incubación a 30°C, de las unidades formadoras de colonias (UFC). Las muestras celulares correspondientes a los distintos tiempos se diluyeron y sonicaron antes de ser plaqueadas.

La sensibilidad al tratamiento crónico con MMS se estudió mediante ensayos de crecimiento en placas de medio rico en presencia de esta droga a distintas concentraciones ("ensayo de gotas"). El crecimiento en placa se realizó a partir de diluciones seriadas (1/10) de cultivos creciendo exponencialmente a una concentración de 1×10^7 céls/ml. Se plaquearon 3,5 µl de cada dilución. Las placas se incubaron durante 3 días a 30°C.

2.6. Observación de células mediante microscopía de fluorescencia

Para la observación al microscopio de fluorescencia, las células se crecieron hasta fase exponencial en medio mínimo suplementado con *Yeast Synthetic Drop-out*. A los tiempos deseados, se tomaron 5 ml del cultivo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 min, se resuspendieron en 200 µl de medio mínimo y se colocaron 5 µl de células en un portaobjetos recubierto con polilisina (VWR). Para la observación de las células se utilizó un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert200 con un objetivo de inmersión 100x, acoplado a una cámara CCD Hamamatsu C9100-02. El porcentaje de células con focos se estimó contando al menos 300 células en tres experimentos comparables.

Para el análisis de la formación de focos con otros tipos de daño se irradiaron las células en G1 con luz ultravioleta (200 J/m²) usando una lámpara UV Stratalinker 1800 (Stratagene), o se trataron en fase S con H₂O₂ (1 mM, Foret).

2.7. Extracción y manipulación de ácidos nucleicos

2.7.1. Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae*

Para la extracción del DNA genómico se utilizó un método basado en el descrito por Rose *et al* (1989), que se describe a continuación. Se recogen unas 10^8 células en fase exponencial de crecimiento, que se centrifugan durante 3 min a 3000 rpm. El precipitado celular se resuspende en 200 µl de solución de lisis (NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, SDS 0,1%), y se transfiere a un tubo de fondo cónico de 1,5 ml con aproximadamente 300 µl de perlas de vidrio de 0,4 mm (Thomas Scientific). Se añaden 200 µl de fenol:cloroformo (1:1) y la suspensión se agita en el vórtex durante 1 min. A continuación se añaden 200 µl de TE y se mezcla unos segundos en el vórtex. Se centrifuga a 14000 rpm durante 5 min y se recoge la fase superior, que se mezcla con un

volumen de cloroformo para eliminar restos de fenol. De nuevo se centrifuga durante 1 min y la fase superior se transfiere a otro tubo y se añaden dos volúmenes de etanol 100% para precipitar el DNA. Se mezcla por inversión y se centrifuga 3 min a 14000 rpm. Tras ello, se descarta el sobrenadante y el precipitado obtenido se lava con etanol 70%, se seca, se resuspende en TE con RNasa A 100 µg/ml y se incuba a 37°C durante al menos 30 min.

2.7.2. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* se utilizó el kit “Minipreps DNA purification system” (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.7.3. Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de DNA por PCR se emplearon diferentes DNA polimerasas (Apdo. 1.7) y sus tampones correspondientes, según las indicaciones del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes variables (20-100 µl), utilizando oligonucleótidos suministrados por Invitrogen y dNTPs adquiridos en Biotools o Roche. Como molde se emplearon cantidades variables de DNA plasmídico o genómico, o una pequeña cantidad de biomasa celular de *S. cerevisiae* tomada directamente de una placa. En este último caso, se rompieron las células calentándolas 10 min a 95°C como paso previo a la reacción de amplificación, que se llevó a cabo con la enzima GoTaq. La duración de los ciclos de extensión y la temperatura de apareamiento fueron variables, dependiendo del tamaño del fragmento a amplificar y de la Tm de los oligonucleótidos.

Cuando los fragmentos amplificados se utilizaron para transformar *S. cerevisiae*, fueron purificados previamente con un kit de Promega (Apdo. 1.7) siguiendo las instrucciones del fabricante, directamente después de la PCR o a partir de una banda de agarosa obtenida tras separar el fragmento mediante electroforesis.

2.7.4. Digestión enzimática de DNA

La digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción se realizó también por procedimientos estándar, de acuerdo a las instrucciones ofrecidas por los fabricantes. En todos los casos, cuando fue necesario, los productos obtenidos se purificaron utilizando el kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.7.5. Electroforesis de DNA

El análisis de las moléculas de DNA se llevó a cabo de forma rutinaria mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto permitió separar fragmentos de distintos

tamaños y estimar la calidad y cantidad del DNA a estudio. También permitió su posterior extracción. Se utilizaron geles de agarosa de 0,7-3%, preparados en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El DNA fue visualizado mediante exposición a luz ultravioleta.

2.7.6. Transferencia de DNA a membranas

Para la transferencia de DNA a membranas desde geles de agarosa, estos se trataron, tras la electroforesis, con HCl 0,25 M a temperatura ambiente durante 15 min. Tras ello, se incubaron con NaOH 0,4 N en agitación suave durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, el DNA se transfirió por capilaridad a membranas de nailon cargadas positivamente (Hybond-XL, GE-Healthcare) durante aproximadamente 16 h, utilizando como solución de transferencia NaOH 0,4 N. Después de la transferencia, las membranas se incubaron brevemente en tampón sodio-fosfato 40 mM (a partir de un stock 0,5 M: Na₂HPO₄ 400 mM, NaH₂PO₄ 100 mM), en agitación suave, y se dejaron secar a temperatura ambiente.

En los experimentos de sustitución de isótopos de densidad, las fracciones obtenidas de los gradientes fueron desnaturalizadas con NaOH 0,4 N y transferidas a membranas de nailon Hybond XL (GE-Healthcare) mediante vacío, utilizando un *slot blotter*.

2.8. Ensayos de sustitución de isótopos de densidad

Esta técnica consiste en la transferencia de células desde un medio con isótopos pesados a un medio con isótopos ligeros (isótopos habituales), o viceversa, para obtener secuencias de DNA híbridas en densidad -gracias a que la replicación del material genético es semiconservativa- que pueden ser identificadas como moléculas replicadas. Utilizando sondas de DNA específicas a lo largo de un cromosoma, este método permite determinar el porcentaje de replicación en cualquier posición de un replicón y la velocidad de las horquillas de replicación. El protocolo empleado se basa en el método descrito por McCarroll y Fangman (1988), adaptado en Tercero *et al* (2000) y descrito en detalle en Tercero (2009). La Figura M1 muestra un esquema general del método, que se explica a continuación.

Las células se crecen a 30°C en medio mínimo “pesado” que contiene 0,1% ¹³C glucosa y 0,01% ¹⁵N (NH₄)₂SO₄ como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, durante ocho generaciones, de modo que todo el DNA de las células es tras ello pesado-pesado (HH). A continuación las células se sincronizan en la fase G1, se transfieren a medio mínimo “ligero” [2% ¹²C glucosa y 0,01% ¹⁴N (NH₄)₂SO₄] y se liberan en la fase S, de modo que el DNA replicado incorpora los isótopos ligeros y pasa a ser

pesado-ligero (HL, replicado). A diferentes tiempos del experimento se toman muestras para la extracción de DNA, que posteriormente se digiere con *Cla*I y *Sa*I y se separa en gradientes de cloruro de cesio. Para la preparación de la solución de CsCl, se disuelven 1,28 g de CsCl (Calbiochem) por cada ml de T₁₀-E₁₀₀ (Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, pH 7.5; índice de refracción de 1,3395). Una vez disuelto, el índice de refracción final debe ser 1,4052. Tras añadir el DNA a la solución de CsCl, los tubos se centrifugan a 245460 g durante 18 h y posteriormente a 76976 g durante 3,5 h, en ambos casos a 22°C y con un valor de deceleración 0.

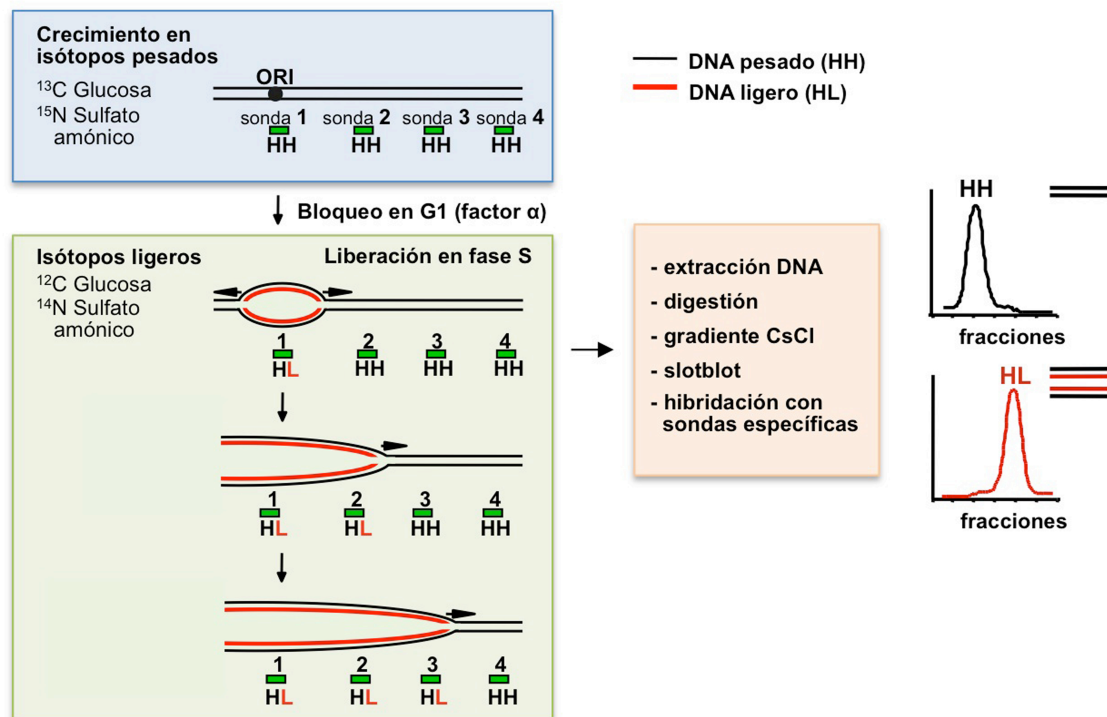


Figura M1. Esquema del ensayo para estudiar la progresión de las horquillas de replicación por sustitución de isótopos de densidad.

Los gradientes se fraccionan usando una bomba peristáltica acoplada a un colector de fracciones, de forma que se obtengan aproximadamente 60 fracciones con un volumen de 90-95 µl. Para comprobar que el gradiente se ha formado correctamente se mide el índice de refracción de un número significativo de fracciones. Las correspondientes a valores de refracción entre 1,407 y 1,403 se transfieren por succión al vacío a membranas de nailon (Hybond-XL, GE Healthcare) mediante el uso de un *slot blotter*, y se hibridan con sondas específicas marcadas con [α -³²P]dCTP que reconocen los fragmentos de restricción *Cla*I/*Sa*I del cromosoma VI (Tercero y Diffley, 2001). Las señales obtenidas se detectaron mediante la exposición en pantallas sensibles a la radiación (Imaging Plate, Fujifilm), que se leyeron en un escáner Fujifilm Bas 1500, y se

cuantificaron empleando el software TINA 2.09. En este ensayo la replicación del DNA se observa como la transferencia de DNA del pico pesado-pesado (HH, no replicado) donde ambas cadenas de DNA contienen únicamente isótopos pesados, al pico pesado-ligero (HL, replicado), donde solo la cadena parental contiene los isótopos pesados. El porcentaje de DNA replicado se calculó utilizando el programa Image J y la ecuación: % replicación = $100 [0,5 \text{ HL}/(\text{HH} + 0,5 \text{ HL})]$, donde HL es el área del pico de DNA pesado-ligero (replicado) y HH el área del pico de DNA pesado-pesado (no replicado).

En la Figura M2 se muestra un esquema del replicón analizado, en el que previamente se habían delecionado los orígenes de replicación *ARS608* y *ARS609* (Tercero y Diffley, 2001), de modo que se puede seguir la progresión de las horquillas de replicación a lo largo de unas 70 kb, desde el origen *ARS607* hasta el final del cromosoma VI. Se muestra también la posición de los fragmentos de restricción en los que se sigue la progresión de las horquillas de replicación.

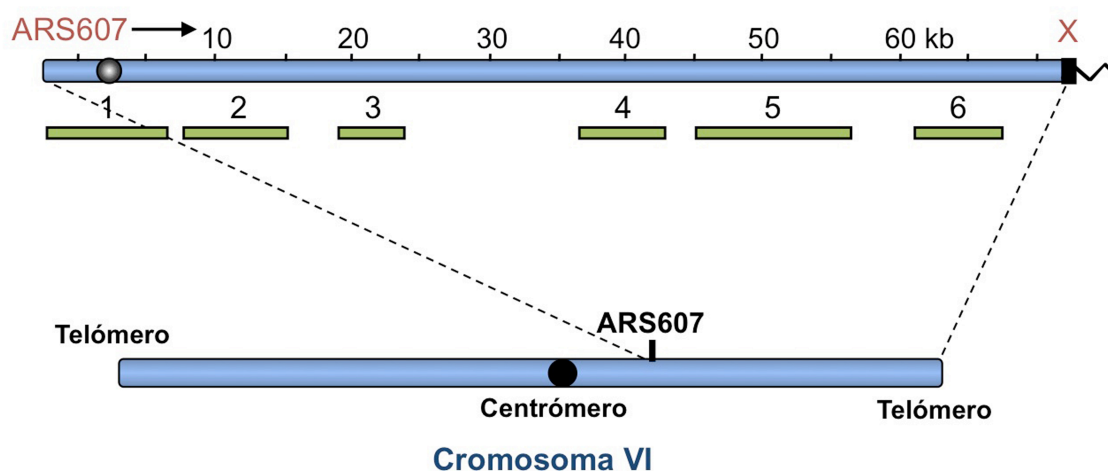


Figura M2. Esquema del replicón en el que se analiza la progresión de las horquillas de replicación. Los experimentos de sustitución de isótopos de densidad se llevaron a cabo en un replicón de 70 kb del cromosoma VI, del que se eliminaron los orígenes *ARS608* y *ARS609* (Tercero & Diffley, 2001), de modo que la replicación comienza en el origen temprano y eficiente *ARS607* y se puede seguir hasta el final del cromosoma. Los números (del 1 al 6) se corresponden con las sondas y los fragmentos de DNA analizados.

2.9. Hibridación de DNA con sondas radiactivas

2.9.1. Marcaje de sondas de DNA

Las sondas empleadas en esta tesis y descritas en la Tabla M4 se amplificaron por PCR desde DNA genómico utilizando la DNA polimerasa Vent. En cada reacción se marcaron 50 ng de DNA desnaturalizado (hirviéndolo durante 10 min) con 50 μCi de [α - ^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol, Pelkin Elmer) mediante la técnica de inserción de nucleótidos al azar, utilizando el kit de marcaje de Roche "*Random Primed DNA Labelling Kit*". El

marcaje se llevó a cabo a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 2 µl de EDTA 0,2 M y los nucleótidos no incorporados se retiraron pasando el total de la reacción por microcolumnas de exclusión de Sephadex G-50 (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Nombre	Coordenadas	Oligonucleótidos empleados
Sonda 1	198945-199832 del cromosoma VI	5'ARS607/3'ARS607
Sonda 2	211014-211996 del cromosoma VI	VI-2.1/VI-2.2
Sonda 3	218011-218700 del cromosoma VI	VI-3.1/VI-3.3
Sonda 4	240009-240679 del cromosoma VI	VI-5.7/VI-5.8
Sonda 5	243315-244200 del cromosoma VI	VI-6.5/VI-6.6
Sonda 6	260048-261088 del cromosoma VI	ARS609-1/ARS609-2
Sonda RAD5	205806-206804 del cromosoma XII	Rad5-FW/Rad5-R

Tabla M5. Sondas de DNA utilizadas en esta tesis.

2.9.2. Hibridación de DNA

Las membranas se prehibridaron durante 1 h a 65°C en 15 ml de la solución de hibridación (Na₂HPO₄ 400 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, EDTA 1 mM, SDS 7%) junto con DNA de esperma de salmón (100 µg/ml) desnaturalizado para bloquear las uniones inespecíficas de las sondas. A continuación se añadieron las sondas marcadas y desnaturalizadas (hirviéndolas 10 min) y se incubaron en agitación suave a 65°C durante toda la noche. Tras la hibridación se realizaron tres lavados de 30 min a 65°C con la solución de lavado [tampón sodio-fosfato 40 mM (stock 0,5 M: Na₂HPO₄ 400 mM, NaH₂PO₄ 100 mM), EDTA 1 mM y SDS 1%]. Tras ello, las membranas se expusieron en pantallas sensibles a la radiación (Imaging Plate, Fujifilm), que se leyeron en un escáner Fujifilm Bas 1500, y/o en películas autorradiográficas (Agfa) con pantallas intensificadoras de la señal (Hyperscreen, Amersham).

2.9.3. Deshibridación de membranas

Cuando fue necesaria su reutilización, las membranas se deshibridaron previamente. Para ello se realizaron, a temperatura ambiente, dos lavados de 30 min en NaOH 100 mM con agitación fuerte y un lavado de 15 min con tampón sodio-fosfato 40 mM con agitación suave.

2.10. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó siguiendo básicamente el protocolo de Foiani *et al* (1994), según se describe a continuación. Se parte de un cultivo en fase exponencial de crecimiento y se recogen por centrifugación células a partir de 5-10 ml de cultivo. Tras

lavarlas con agua, el precipitado se resuspende en 300 µl de ácido tricloroacético al 20%, se transfiere a un tubo de fondo cónico de 1,5 ml con el mismo volumen de perlas de vidrio y se agita en el vórtex durante 1 min. La suspensión obtenida se transfiere a un nuevo tubo, mientras que las perlas se lavan con 200 µl de TCA 5% y los sobrenadantes se añaden al extracto recogido previamente. Tras ello, el extracto se centrifuga durante 10 min a 3000 rpm, se descarta el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 200 µl de tampón Laemmli (Tris 60 mM pH 6,9, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,004%). A continuación se añaden 50 µl de Tris base 1 M para neutralizar el pH. Las muestras se hierven durante 3 min y se clarifican por centrifugación (10 min a 3000 rpm). Los sobrenadantes se transfieren a tubos nuevos y se guardan a -20°C. Todo el proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente.

2.11. Electroforesis de proteínas e inmunoblot

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 7,5 ó 10%. Las electroforesis se realizaron de manera habitual a 150 V, durante 1,5-2,5 h, en tampón TGS (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS, 0,1% pH 8.3; Bio-Rad). A continuación, los geles se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 [Bio-Rad], SDS 0,0375%, metanol 20%) durante 10 min. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-ECL, GE Healthcare) utilizando un *blotter* (GE-Healthcare) para transferencia semi-seca, durante 30-60 min (dependiendo de la proteína), a 15 V. Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de Ponceau S al 0,2% en TCA 3% y se escanearon para usar estas tinciones como control de carga y transferencia.

Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se bloquearon en una solución de leche desnatada en polvo (Sveltese, Nestlé) al 5% en TBST (TBS: NaCl 136 mM, KCl 2,68 mM, Tris Base 24 mM, ajustado a pH 8,0, suplementado con Tween-20 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. A continuación se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario (en una solución de leche al 5% en TBST), se lavaron 3 veces durante 10 min con TBST, se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario apropiado (en una solución de leche al 5% en TBST) acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) y se lavaron 3 veces durante 10 min con TBST. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL prime, GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante, tras lo cual las membranas se expusieron en autorradiografías (Agfa). Para la cuantificación de las bandas de proteínas se utilizó un densitómetro GS-800 y el programa *Quantity One* (Bio-Rad).

2.12. Ensayos de actividad quinasa *in situ* para Rad53

Para el ensayo de actividad quinasa *in situ* de Rad53 se siguió básicamente el protocolo descrito por Pellicoli *et al* (1999), según se describe a continuación. Las muestras de proteínas se obtuvieron mediante extracción con TCA, según lo descrito en el apartado 2.10. Las proteínas se separan en geles SDS-PAGE al 7,5% a 150 V, durante 2,5 h. El gel se transfiere a una membrana de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare) previamente sumergida durante unos segundos en metanol y equilibrada posteriormente en tampón de transferencia. Las proteínas retenidas en la membrana se tratan con una solución desnaturalizante (cloruro de guanidinio 7 M, DTT 50 mM, EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras dos lavados de 10 min con TBS, la membrana se incuba en una solución renaturalizante (DTT 2 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 140 mM, BSA 1%, Tween-20 0,04%) durante 12-18 h a 4°C, con agitación suave. Tras la incubación, la membrana se lava con Tris-HCl 30 mM durante 30-60 min. Para la reacción de quinasa, la membrana se incuba primero 15 min a temperatura ambiente en tampón quinasa (DTT 1 M, EGTA 0,1 mM, MgCl₂ 20 mM, MnCl₂ 20 mM, Hepes/NaOH 40 mM pH 8,0, ortovanadato de sodio 100 µM), y a continuación durante 1 h en tampón quinasa suplementado con γ -³²ATP (10 µCi/ml). Finalmente, la membrana se somete a dos lavados de 10 min con Tris-HCl 30 mM pH 7,5, un lavado con Tris-HCl 30 mM pH 7,5 - Nonidet 0,1%, otro de 10 min con Tris-HCl 30 mM pH 7,5, y un último de 10 min con KOH 1 M. Posteriormente se lava en agua destilada durante unos segundos y se hace otro lavado con TCA al 10%. Finalmente, tras enjuagarla brevemente con agua destilada, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min. La señal obtenida se detectó mediante la exposición en películas autorradiográficas con pantallas intensificadoras de la señal y revelado de las mismas.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS COMPONENTES DE LA RUTA *RAD6/RAD18* A LA TOLERANCIA AL DAÑO EN EL DNA DURANTE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA

La ruta *RAD6/RAD18* es crucial para la respuesta al daño en el DNA, y los mutantes de sus componentes son sensibles al tratamiento con diversos agentes que dañan el DNA e interfieren con la replicación del material genético, como el alquilante MMS, compuesto ampliamente utilizado en estudios de replicación y daño en el DNA (Paulovich y Hartwell, 1995; Tercero y Diffley, 2001). Para analizar cuál es la contribución relativa de cada una de las ramas de esta ruta a la replicación cromosómica cuando existen lesiones en el material genético, limitamos la inducción de daño en el DNA a una única fase S, y a continuación estudiamos las consecuencias de la ausencia de cada uno de los componentes de la ruta *RAD6/RAD18*.

Dado que las proteínas de esta ruta están altamente conservadas evolutivamente, desde levaduras hasta humanos, como se explica en la Introducción, el empleo de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae* nos permite trabajar con un modelo de sencillo manejo, que proporciona grandes ventajas para el estudio de la replicación cromosómica.

1.1. Progresión en la fase S y viabilidad de las células carentes de cada una de las polimerasas de síntesis a través de lesiones en condiciones de daño en el DNA causado por el MMS

Para estudiar el efecto de la ausencia de cada una de las polimerasas de síntesis a través de lesiones (TLS) en la progresión en la fase S bajo condiciones de daño en el DNA, construimos, en primer lugar, mutantes de delección de los genes que codifican cada una de estas polimerasas: *rev1Δ*, *rev3Δ* y *rad30Δ*. En los tres casos, las células mutantes crecieron normalmente a distintas temperaturas (16°C, 24°C, 30°C, 37°C) en medio YPD, en comparación con las células control *TLS*⁺. A continuación, analizamos por citometría de flujo la progresión en la fase S en presencia de DNA alquilado de cada uno de los mutantes en comparación con células silvestres. Para ello se sincronizaron cultivos logarítmicos de cada estirpe en la fase G1 por la adición al medio de cultivo de la feromona factor α , y posteriormente se liberaron en fase S en medio fresco con o sin MMS (0,033%) (Figura R1A). A lo largo del experimento se tomaron muestras para su análisis por citometría de flujo y para el estudio de la viabilidad celular. Por citometría de flujo se observó (Figura R1B) que, en ausencia de MMS, las células de las cuatro estirpes habían completado la replicación de su material genético 60 min después de la liberación del bloqueo en G1, tras lo cual continuaban ciclando.

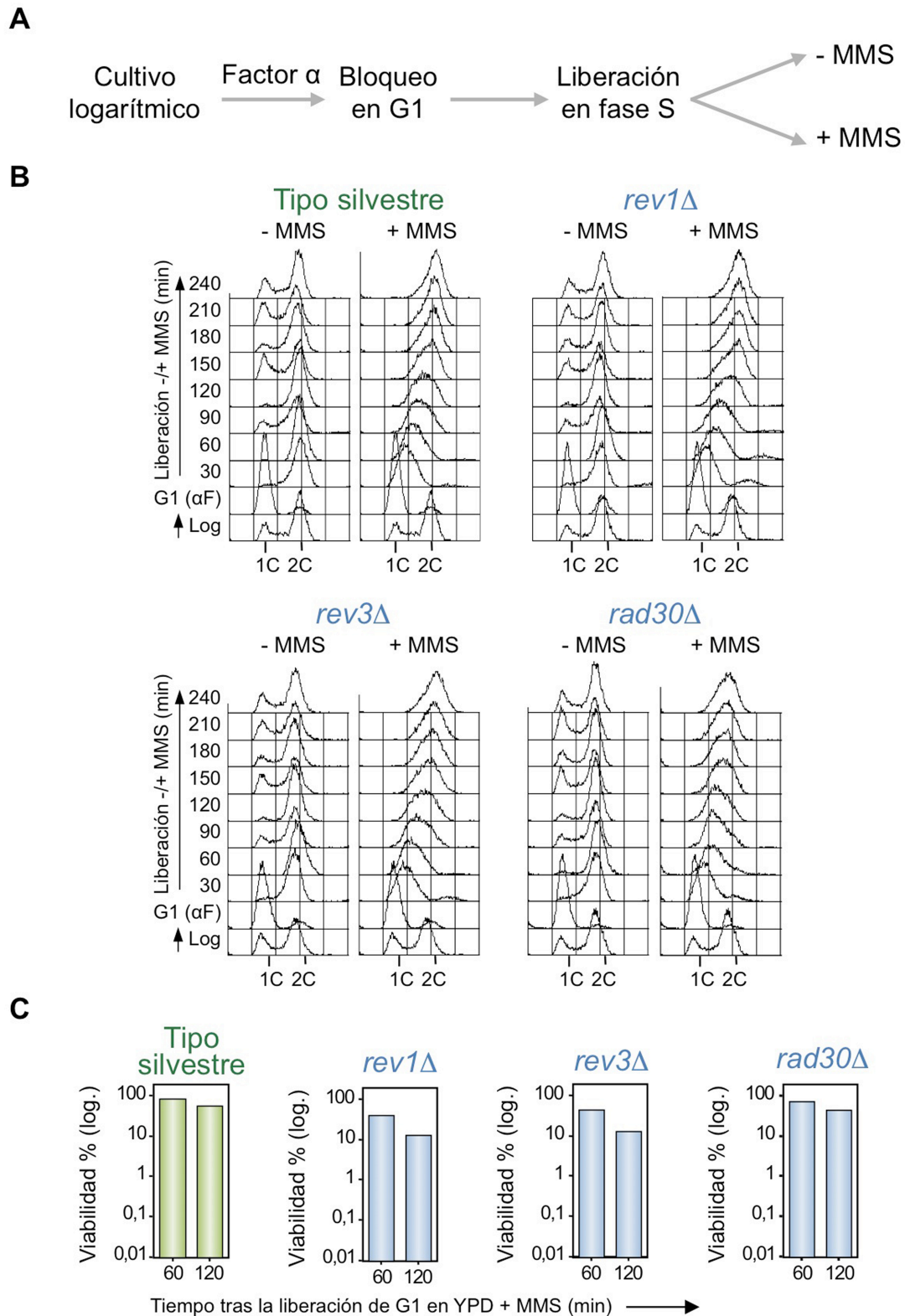


Figura R1. Progresión en la fase S y viabilidad de las células carentes de las polimerasas de TLS en presencia de MMS. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron cultivos exponenciales de células silvestres (cepa YMO13), *rev1* Δ (cepa YMO20), *rev3* Δ (cepa YMO7) y *rad30* Δ (cepa YMO10) en la fase G1 con la feromona factor α y a continuación se liberaron en la fase S en ausencia o presencia de MMS (0,033%) en el medio. (B) Análisis de la progresión en el ciclo celular mediante citometría de flujo, que permite estimar el contenido de DNA de las células. (C) Viabilidad celular tras el tratamiento con MMS (0,033%) durante la fase S, estimada mediante el recuento de unidades formadoras de colonias en placa.

En presencia del agente alquilante las células entraron en la fase S de manera normal. Sin embargo, la progresión a través de la fase S continuó en todos los casos de forma lenta en medio con MMS al 0,033% (Figura R1B), debido a las lesiones en el DNA, como se ha demostrado previamente (Paulovich y Hartwell, 1995; Tercero y Diffley, 2001). Al final del experimento, las células del tipo silvestre completaron la duplicación de su material genético y mostraron un contenido de DNA 2C. El análisis de la viabilidad celular (Figura R1C) mostró, como cabía esperar, que las células de tipo silvestre mantienen una alta viabilidad (analizada mediante recuento de unidades formadoras de colonias) tanto en ausencia como en presencia de daño en el DNA, ya que cuentan con todas las rutas de reparación, *checkpoint* y tolerancia al daño en el DNA para hacer frente a las lesiones que se producen.

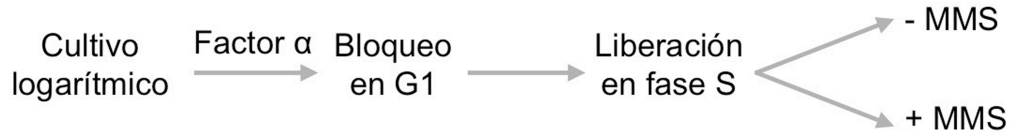
Las células *rev1Δ* mostraron, en presencia de MMS, una progresión en la fase S similar a la de las células del tipo silvestre (Figura R1B), y la pérdida de viabilidad celular causada por el tratamiento con la droga fue muy moderada (Figura R1C). De modo parecido, la cepa *rev3Δ* (carente de Pol ζ) no presentó defectos apreciables en la progresión en la fase S con respecto al tipo silvestre (Figura R1B), y mostró una bajada de viabilidad similar a la de las células *rev1Δ* tras la exposición al MMS (Figura R1C). Las células mutantes *rad30Δ* (carentes de Pol η), mostraron también una progresión en la fase S (Figura R1B) y una viabilidad (Figura R1C) tras el tratamiento con MMS prácticamente indistinguible a las de las células del tipo silvestre. Estos resultados indican que la ausencia de cualquiera de las polimerasas de síntesis a través de lesiones no tiene consecuencias importantes cuando las células de *S. cerevisiae* son tratadas con MMS durante la fase S.

1.2. Las polimerasas de síntesis a través de lesiones pueden sustituirse entre sí para responder al daño en el DNA causado por el MMS

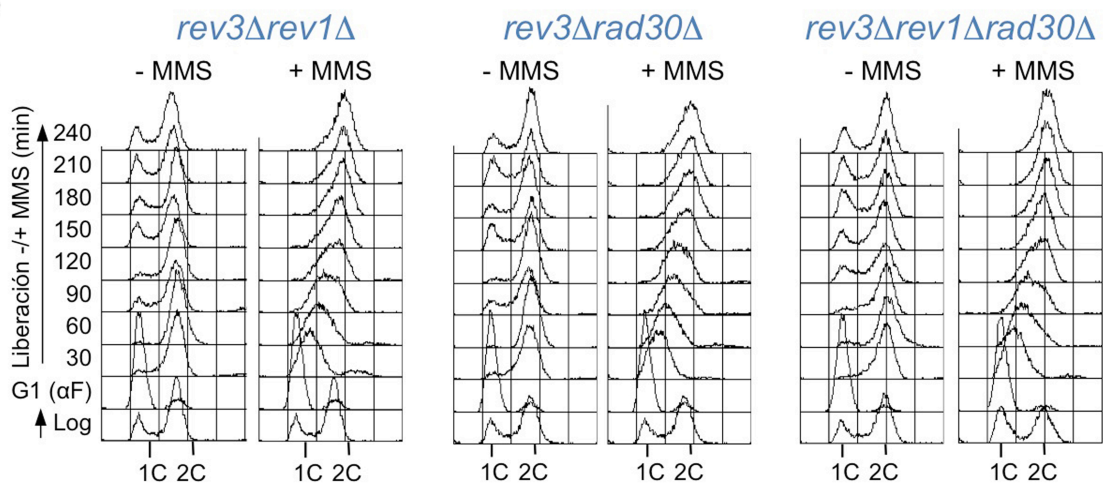
El escaso efecto causado por la ausencia de cada una de las polimerasas de TLS en la progresión en la fase S y en la viabilidad de las células tratadas con MMS, nos hizo plantearnos la posibilidad de que fuese posible la sustitución entre dichas polimerasas para hacer frente a las lesiones en el material genético. Para analizar si este era el caso, analizamos si los efectos de la ausencia de más de una de las polimerasas de TLS eran aditivos o sinérgicos. Para ello, construimos mutantes con distintas combinaciones de deleciones de los genes que codifican las polimerasas de TLS: *rev3Δrev1Δ*, *rev3Δrad30Δ* y *rev1Δrev3Δrad30Δ*. Todos ellos crecieron normalmente en medio YPD, y estudiamos en los mismos la progresión en la fase S y la viabilidad celular en presencia de daño en el DNA (Figura R2). Al igual que en los apartados anteriores, las células se sincronizaron en

G1 con factor α y se liberaron posteriormente en la fase S en ausencia o presencia de MMS (0,033%). Al liberar las células en ausencia de daño en el DNA, todos los mutantes completaron la replicación de su genoma y progresaron normalmente en el ciclo celular (Figura R2B), al igual que el tipo silvestre y los mutantes individuales (Figura R1B).

A



B



C

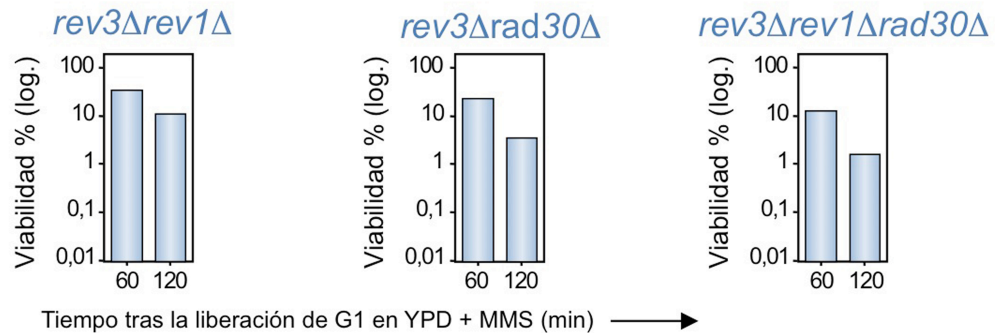


Figura R2. Progresión en la fase S y viabilidad de las células carentes de distintas combinaciones de las polimerasas de TLS en presencia de MMS. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron cultivos exponenciales de células *rev3Δrev1Δ* (cepa YMO15), *rev3Δrad30Δ* (cepa YMO16) y *rev3Δrev1Δrad30Δ* (cepa YMO27) en la fase G1 con la feromona factor α , y a continuación se liberaron en la fase S en ausencia o presencia de MMS (0,033%) en el medio. (B) Análisis de la progresión en el ciclo celular mediante citometría de flujo. (C) Viabilidad celular tras el tratamiento con MMS (0,033%) durante la fase S, estimada mediante el recuento de unidades formadoras de colonias en placa.

Cuando las células *rev3Δrev1Δ* se sincronizaron en G1 con factor α y se liberaron posteriormente en medio fresco con MMS, mostraron una progresión en la fase S (Figura R2B) y una viabilidad (Figura R2C) igual a la del mutante simple *rev3Δ* (Figura R1B y C).

Al estudiar el mutante *rev3Δrad30Δ*, en el que eliminamos tanto la rama de síntesis translesión dependiente de Pol ζ, como la dependiente de Pol η, observamos que la citometría de flujo mostró una progresión en la fase S (Figura R2B) muy similar a la de los mutantes simples y a la de las células silvestres (Figura R1B). Sin embargo, las células de este mutante doble presentaron una mayor pérdida de viabilidad en presencia de MMS (Figura R2C) que las de los mutantes simples *rev3Δ* o *rad30Δ* (Figura R1C).

El triple mutante *rev1Δrev3Δrad30Δ* exhibió el mismo comportamiento en términos de viabilidad y progresión en la fase S (Figura R2B y C) en respuesta al tratamiento con el agente genotóxico que el mutante *rev3Δrad30Δ* (Figura R2B y C). Podemos concluir por tanto que, en las condiciones empleadas, las polimerasas de síntesis a través de lesiones pueden sustituirse entre sí, al menos parcialmente, y que solo cuando las células carecen tanto de Pol ζ como de Pol η se observa un efecto moderado, pero significativo, en la respuesta al daño en el DNA causado por el tratamiento con MMS.

1.3. Progresión en la fase S y viabilidad de las células carentes de la rama de tolerancia al daño en el DNA dependiente de Rad5 en condiciones de daño en el DNA causado por el MMS

Para examinar las consecuencias del tratamiento con MMS en células carentes de la rama de tolerancia al daño en el DNA libre de error, construimos un mutante de delección de *RAD5*, *rad5Δ*. Las células de este mutante son de mayor tamaño que las del tipo silvestre o las de los mutantes de TLS, si bien *rad5Δ* es viable y crece normalmente a distintas temperaturas (16°C, 24°C, 30°C, 37°C) en medio YPD.

En este caso, al realizar el mismo tipo de experimentos descritos anteriormente, encontramos una situación muy diferente (Figura R3). Así, al estudiar la progresión en el ciclo celular por citometría de flujo (Figura R3B), observamos que mientras que la progresión en la fase S de las células *rad5Δ* transcurrió de forma similar a la de las células del tipo silvestre en ausencia de MMS, en presencia de la droga la fase S comenzó normalmente, pero no llegó a completarse, y las células mantuvieron un contenido de DNA inferior a 2C a lo largo de todo el experimento). Además, al analizar la viabilidad celular en estas condiciones (Figura R3C), observamos que las células *rad5Δ* tratadas con MMS mostraron una dramática bajada de la viabilidad en comparación con las células control del tipo silvestre, así como con las células carentes de TLS (Figura R1C y R3C, panel derecho).

Estos datos, junto con los de los apartados anteriores, indican que tanto la rama dependiente de las polimerasas de TLS como la rama libre de error dependiente de Rad5, son importantes para la respuesta celular al daño en el DNA causado por el MMS durante

la fase S, si bien el papel del segundo mecanismo sería claramente predominante, al menos en las condiciones estudiadas.

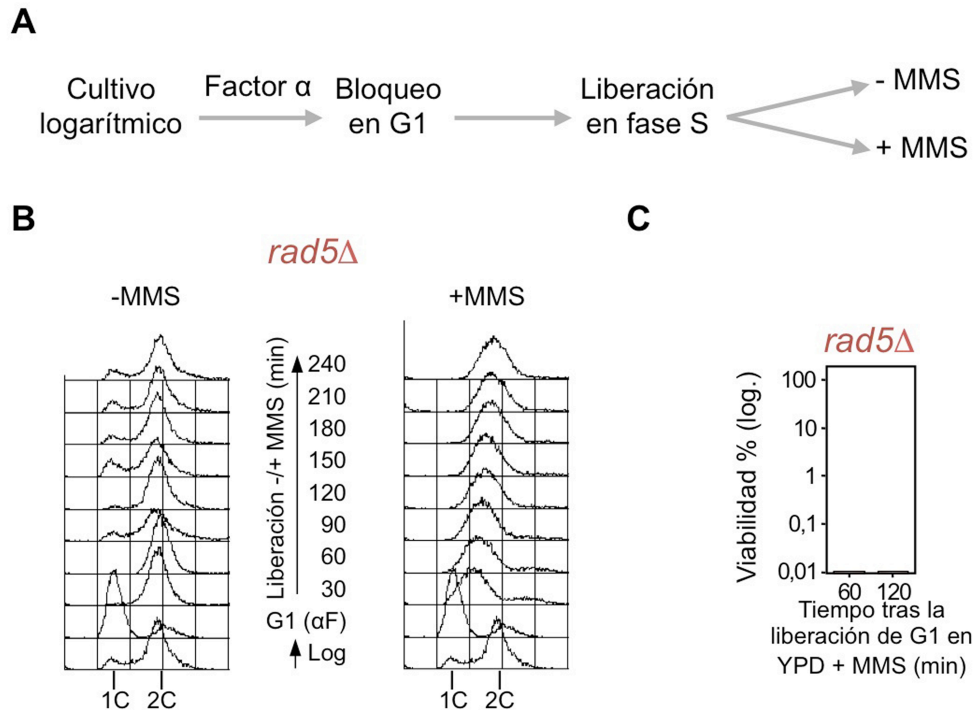


Figura R3. Progresión en la fase S y viabilidad de las células *rad5Δ* en presencia de MMS. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron cultivos exponenciales de células *rad5Δ* (cepa YMO18) en la fase G1 con la feromona factor α , y a continuación se liberaron en la fase S en ausencia o presencia de MMS (0,033%) en el medio. (B) Análisis de la progresión en el ciclo celular mediante citometría de flujo. (C) Viabilidad celular tras el tratamiento con MMS (0,033%) durante la fase S, estimada mediante el recuento de unidades formadoras de colonias en placa.

1.4. Rad5 es fundamental para la respuesta celular al daño en el DNA ocasionado por el MMS durante la replicación cromosómica

Los resultados anteriores sugieren que Rad5 es necesaria para completar la progresión de la fase S en condiciones de daño en el DNA y muestran las graves consecuencias para la viabilidad celular provocadas por el MMS en ausencia de esta proteína. Además, el papel de Rad5 parece ser más importante que el de las polimerasas de TLS para hacer frente al daño en el DNA causado por el MMS. Para analizar en mayor detalle la contribución de cada una de las dos ramas de la ruta *RAD6/RAD18* a la replicación cromosómica y a la supervivencia celular en presencia de daño en el material genético, y dado que solo apreciamos el efecto de la carencia de las polimerasas de TLS cuando todas están ausentes, comparamos a continuación en más profundidad las cepas *rev1Δrev3Δrad30Δ* (a la que llamaremos *tlsΔ* a partir de ahora) y *rad5Δ*. Para ello realizamos los experimentos que se describen a continuación, a dosis alta (0,033%) y baja (0,0033%) de MMS, con células del tipo silvestre, mutantes *tlsΔ*, y mutantes *rad5Δ*.

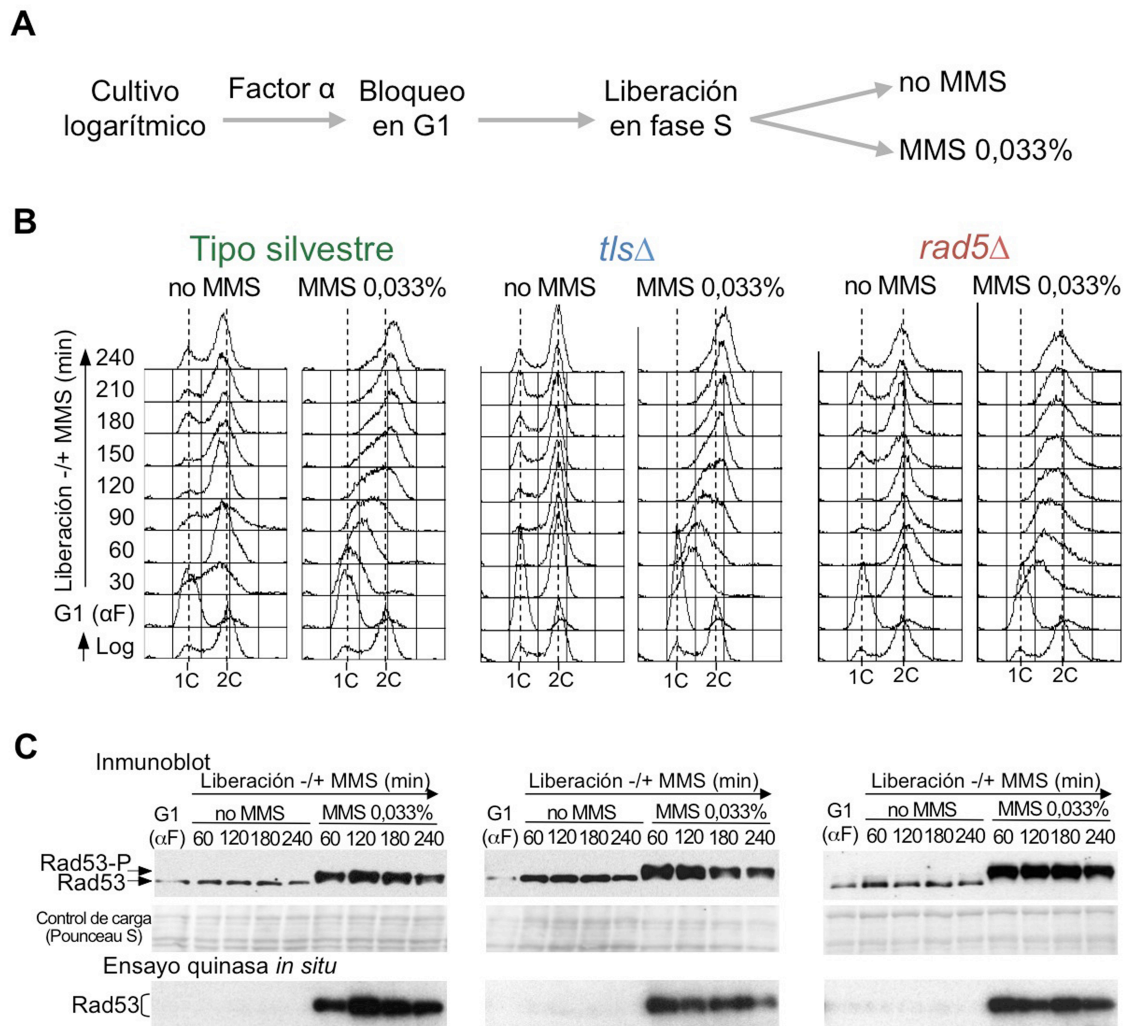


Figura R4. Rad5 juega un papel principal en la tolerancia al daño en el DNA causado por MMS durante la fase S. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células del tipo silvestre (cepa YMO13), *tlsΔ* (cepa YMO27) y *rad5Δ* (cepa YMO18) en la fase G1 con factor α , tras lo cual se liberaron en medio +/- MMS (0,033%). (B) La progresión en el ciclo celular se estudió analizando el contenido en DNA de las células mediante citometría de flujo. (C) Inmunoblot y análisis *in situ* de la autofosforilación de Rad53.

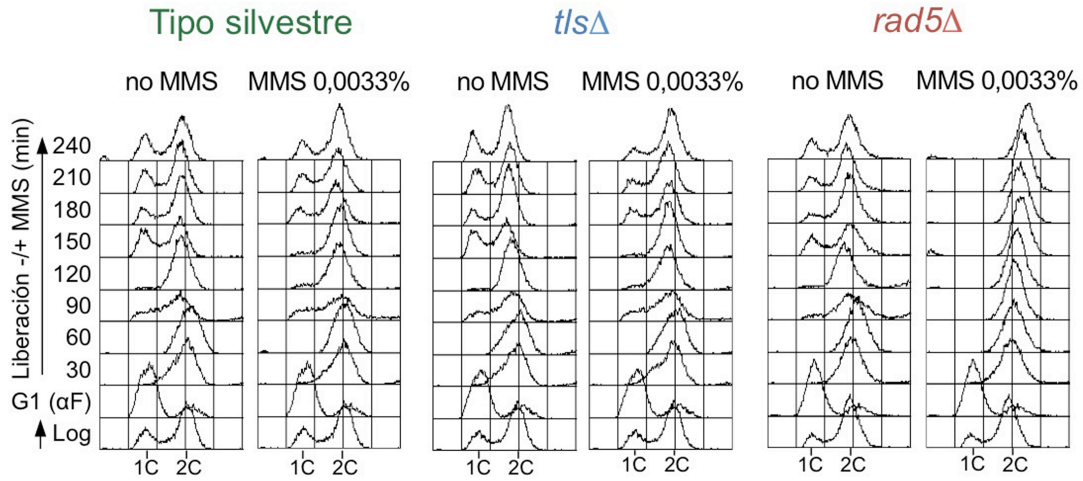
Se sincronizaron en G1 células de tipo silvestre, como control, *tlsΔ* y *rad5Δ*, tras lo cual se liberaron en medio fresco sin o con MMS (0,033%) (Figura R4A). Además de monitorizar la progresión de la fase S (Figura R4B), tanto en presencia como en ausencia de daño en el DNA, como ya se hizo en los experimentos anteriores, en todas las cepas se estudió el estado de activación del *checkpoint* de la fase S. Para ello, en cada punto se tomaron muestras para la extracción de proteínas, y se analizó en las mismas el estado de fosforilación de la quinasa del *checkpoint* Rad53, así como la posible adquisición de actividad por parte de esta proteína (Figura R4C). Los resultados mostraron que la carencia de TLS o Rad5 no induce la activación del *checkpoint* en ausencia de daño en el DNA, dado que Rad53 no está fosforilado ni adquiere actividad quinasa (inmunoblot y ensayo de quinasa *in situ*, Figura R4C). Esto indica que la

ausencia de estas proteínas no causa perturbaciones en la replicación que den lugar a la activación del *checkpoint* como respuesta, lo que está de acuerdo con lo observado por citometría de flujo, ya que los mutantes ciclan normalmente en ausencia de daño exógeno. En cambio, el *checkpoint* de la fase S se activó de manera normal en las tres estirpes tras el tratamiento con MMS, como muestran la fosforilación de Rad53 y la subsecuente adquisición de actividad quinasa por parte de la misma (immunoblot y ensayo de quinasa *in situ*, Figura R4C).

A



B



C

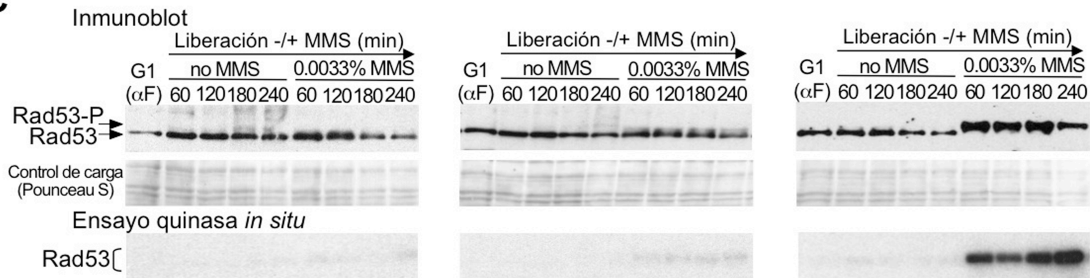


Figura R5. Rad5 es necesaria para hacer frente al daño en el DNA causado por una dosis baja de MMS durante la fase S. (A) Esquema del experimento. Se bloquearon células del tipo silvestre (cepa YMO13), *t/sΔ* (cepa YMO27) y *rad5Δ* (cepa YMO18) en la fase G1 con factor α , tras lo cual se liberaron en medio +/- MMS (0,0033%). (B) La progresión en el ciclo celular se estudió analizando el contenido en DNA de las células mediante citometría de flujo. (C) Inmunoblot y análisis *in situ* de la autofosforilación de Rad53.

Para profundizar en el estudio de la importancia de Rad5 en la respuesta a las lesiones en el DNA inducidas por MMS durante la fase S que sugieren los experimentos anteriores, buscamos una dosis de esta droga que no causase efectos detectables en las

células de tipo silvestre y, a continuación, analizamos las consecuencias que origina el mismo tratamiento con MMS en las estirpes *tlsΔ* y *rad5Δ*. Se sincronizaron células control del tipo silvestre en G1 y a continuación se liberaron en medio suplementado con una décima parte de la concentración de MMS usada anteriormente (0,0033%) (Figura R5A). La citometría de flujo muestra que estas células no experimentan ningún retraso aparente en la progresión en la fase S, debido al bajo número de lesiones en el DNA, y continúan ciclando de manera normal (Figura R5B). Además, Rad53 no se activó en estas condiciones (Figura R5C). Estos resultados indican que las lesiones en el DNA que se producen por la exposición a esta baja dosis de MMS no interfieren con la progresión en el ciclo celular, y que el daño inducido en el DNA, a diferencia de lo que ocurre en la Figura R4C, estaba por debajo del umbral necesario para desencadenar la activación del *checkpoint* (Hishida *et al*, 2009; Tercero *et al*, 2003). El tratamiento con 0,0033% de MMS durante la fase S tampoco provocó un efecto aparente en las células carentes de TLS, que siguieron ciclando de manera normal (Figura R5B) y no activaron Rad53 (Figura R5C). Sin embargo, sorprendentemente, el mismo tratamiento con MMS impidió que las células *rad5Δ* progresasen a lo largo del ciclo celular (Figura R5B), e hizo que permaneciesen bloqueadas con un contenido de DNA de 2C como células con grandes gemas y cromatina sin dividir (Figura R6).

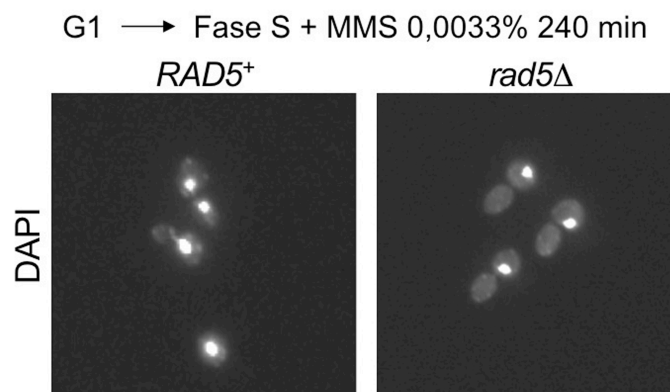


Figura R6. Las células mutantes *rad5Δ* se acumulan con un contenido de DNA 2C, gemas grandes y cromatina sin dividir tras el tratamiento con MMS 0,0033% durante la fase S. Las células control *RAD5⁺* (cepa YMO13) y *rad5Δ* (cepa YMO18) se sincronizaron en G1 con factor α y a continuación se liberaron en medio con MMS (0,0033%) durante 240 min. Las muestras se corresponden con las del experimento de la Figura R5. El DNA se tiñó con DAPI y las células se analizaron por microscopía de fluorescencia.

Además, en estas condiciones, a diferencia de las cepas silvestre y *tlsΔ*, Rad53 se activó en el mutante *rad5Δ*, como muestran el inmunoblot y el ensayo de quinasas *in situ* (Figura R5C, panel derecho). A pesar de que las células *rad5Δ* tienen un contenido de DNA de 2C, la activación del *checkpoint* se debe a las lesiones en el DNA inducidas

durante la fase S, ya que si se bloquean en G2/M y se tratan con MMS a la dosis de 0,0033%, no se observa ni fosforilación de Rad53 ni adquisición de actividad quinasa por parte de esta proteína (Figura R7). En conjunto, estos resultados indican que incluso el tratamiento con una dosis baja de MMS durante la fase S, que aparentemente no ocasiona consecuencias en células del tipo silvestre o en mutantes *tlsΔ*, origina serios problemas en las células que carecen de Rad5, hasta el punto de que induce la activación del *checkpoint* e impide la división celular. Esto refleja la función crucial de esta proteína en la respuesta al daño inducido por MMS durante la fase S.

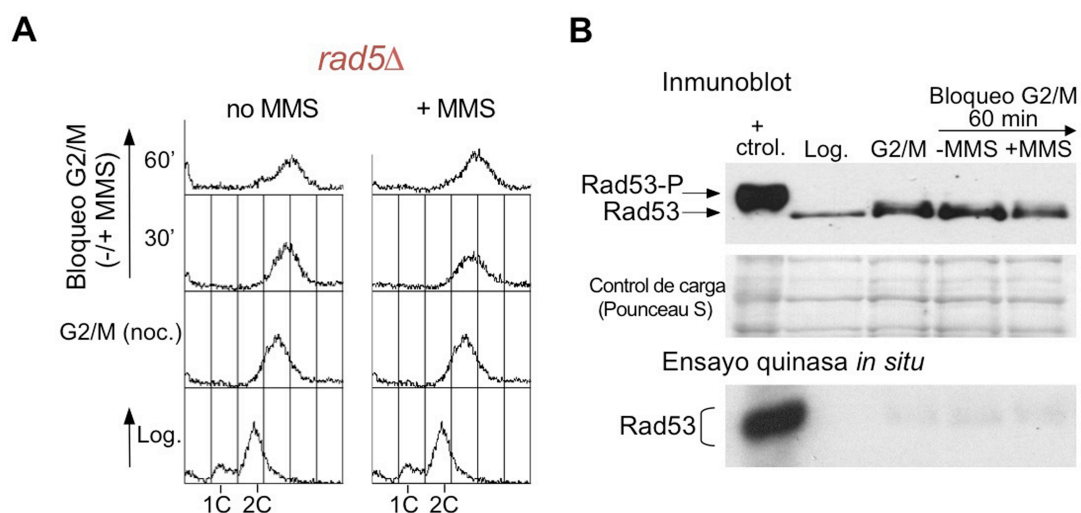


Figura R7. El *checkpoint* de fase S no se activa cuando las células *rad5Δ* se encuentran en G2/M y se tratan con MMS (0,0033%). Se sincronizaron células *rad5Δ* (cepa YMO18) en G2/M utilizando nocodazol (3 h), tras lo cual se mantuvieron durante 60 min adicionales en medio con dicha droga, en ausencia o en presencia de MMS (0,0033%). **(A)** A los tiempos indicados se tomaron muestras y el estado de las células en el ciclo celular se monitorizó por citometría de flujo. **(B)** La posible activación de Rad53 se analizó en cada punto por inmunoblot y ensayo de actividad quinasa *in situ*. El inmunoblot muestra que Rad53 no está hiperfosforilada en células tratadas con MMS en G2/M, lo cual se correlaciona con la ausencia de autofosforilación de Rad53 en el ensayo de quinasa *in situ*. El control positivo pertenece al experimento de la Figura R5 (células *rad5Δ* tratadas con MMS 0,0033% durante 1 h tras ser liberadas de G1). El doblete de Rad53 en G2/M se ha descrito previamente y no se debe a una modificación de esta proteína inducida por daño en el DNA (Diani *et al*, 2009; Schleker *et al*, 2010; Tercero *et al*, 2003).

1.5. Viabilidad de las células *tlsΔ* y *rad5Δ* tras el tratamiento con distintas dosis de MMS durante la fase S

Para avanzar en el conocimiento de la contribución de Rad5 a la tolerancia a las lesiones en el DNA durante la fase S, examinamos la viabilidad celular en el tipo de experimentos anteriormente mostrados, utilizando diferentes dosis de MMS. Para ello, se

sincronizaron las células en G1 y se liberaron después en la fase S en medio fresco al que se añadieron diferentes concentraciones de MMS (Figura R8).

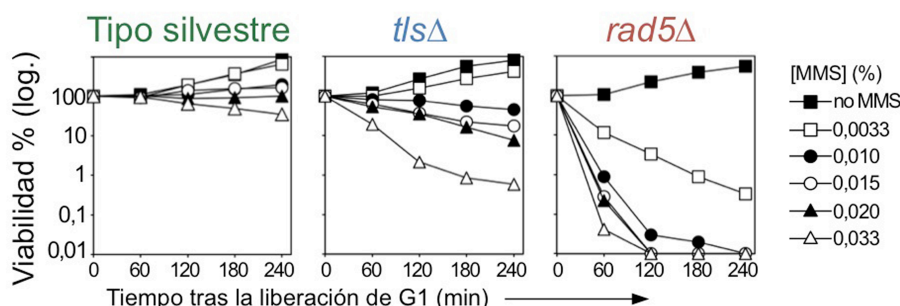


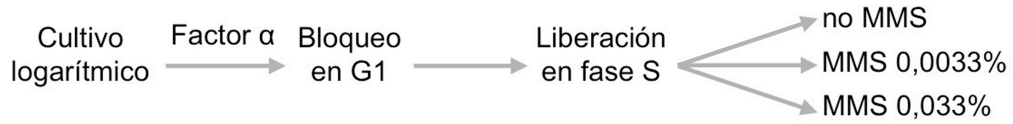
Figura R8. Rad5 es fundamental para la supervivencia de las células tratadas con distintas dosis de MMS durante la fase S. Se sincronizaron células silvestres (cepa YMO13), *tlsΔ* (cepa YMO27) y *rad5Δ* (cepa YMO18) en la fase G1 con factor α y se liberaron en la fase S en presencia de distintas concentraciones de MMS. La viabilidad celular se estimó a los tiempos indicados mediante el recuento de unidades formadoras de colonias.

Las células silvestres mantuvieron una alta viabilidad a lo largo del experimento en todos los casos, y las células *tlsΔ* solo sufrieron una modesta pérdida de viabilidad en comparación con el control. De hecho, la pérdida de viabilidad del mutante *tlsΔ* solo fue notable, pero aún moderada, cuando las células se trataron con la mayor dosis de MMS utilizada. Por el contrario, las células *rad5Δ* mostraron una dramática bajada de viabilidad tras el tratamiento con MMS en comparación con las cepas silvestre o *tlsΔ* (Figura R8). Incluso la exposición a la más baja de las concentraciones de MMS utilizadas, que resultó inocua para las células silvestres o *tlsΔ* (Figuras R5 y R8), fue dañina para las células *rad5Δ*, que mostraron una pérdida significativa de viabilidad (Figura R8). Estos resultados, junto con los mostrados anteriormente (Figura R4 y R5), indican que Rad5 tiene un papel principal en la respuesta celular que permite la tolerancia a las lesiones en el DNA causadas durante la fase S por un agente nocivo como el MMS. Sin embargo, la bajada de viabilidad que presentan las células *rad5Δ* (Figura R8) es ligeramente menos acusada que la de un mutante *rad18Δ*, lo que apunta hacia una pequeña, pero significativa contribución de las polimerasas de TLS en la respuesta al MMS.

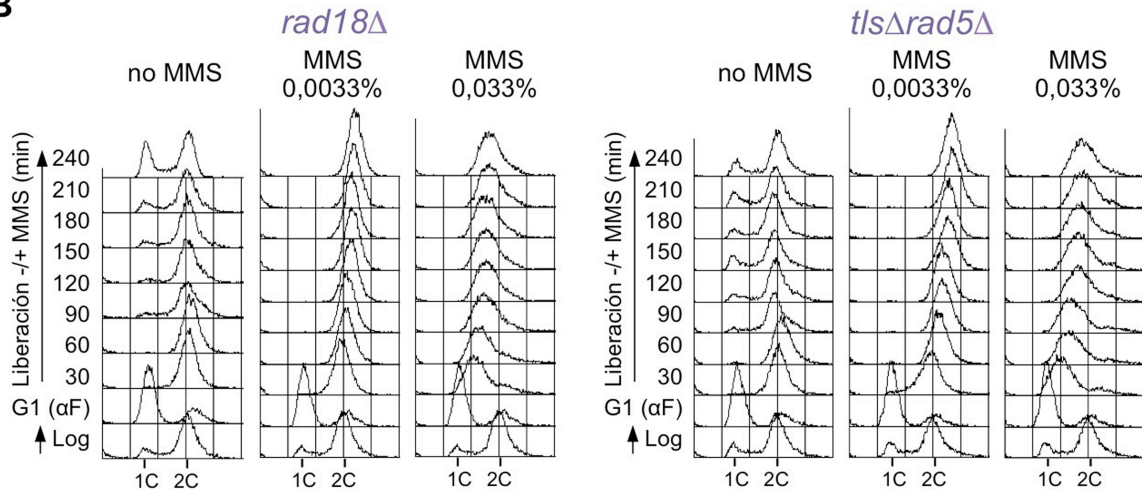
Para analizar si la diferencia en la supervivencia celular entre los mutantes *rad18Δ* y *rad5Δ* se debía a TLS, construimos un mutante que carecía de todas las polimerasas de TLS y de Rad5 (*rev3Δrad30Δrev1Δrad5Δ*, es decir, *tlsΔrad5Δ*). Como se muestra en la Figura R9B, tras liberar cultivos sincronizados en G1 en ausencia o presencia de MMS a distintas concentraciones, la progresión en la fase S fue en ambos casos similar a la de un mutante *rad5Δ* (Figuras R4 y R5). En ausencia de daño en el DNA, las células habían replicado su material genético a los 60 min. Al entrar en la fase S en presencia de la

concentración más baja de MMS (0,0033%), las células alcanzaron un contenido de DNA de 2C, pero no pudieron pasar a un nuevo ciclo, mientras que la mayoría de las células tratadas con MMS 0,033% no consiguieron completar la replicación del DNA.

A



B



C

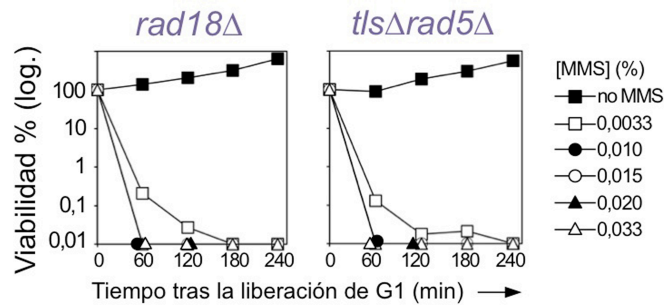


Figura R9. La sensibilidad de las células *rad18Δ* al tratamiento con MMS se debe al efecto combinado de la ausencia de las polimerasas de TLS y de Rad5. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *rad18Δ* (cepa YJT116) y *tlsΔrad5Δ* (cepa YMO28) en la fase G1 con factor α y se liberaron posteriormente en la fase S en presencia de MMS (0,0033% o 0,033%). **(B)** La progresión en el ciclo celular se siguió por citometría de flujo. **(C)** La viabilidad celular se estimó a los tiempos indicados, mediante el recuento de unidades formadoras de colonias.

Además, la viabilidad de los mutantes *tlsΔrad5Δ* y *rad18Δ* fue muy similar (Figura R9C), lo que indica que la extrema sensibilidad al tratamiento con MMS de las células que no tienen Rad18 se debe a la combinación del efecto de carecer de las funciones de Rad5 y TLS. Por tanto, nuestros resultados muestran que ambas ramas de la ruta

RAD6/RAD18 de tolerancia al daño en el DNA son importantes para la respuesta a las lesiones originadas durante la fase S por el agente modelo MMS. Sin embargo, la rama libre de error de esta ruta, mediada por Rad5, tiene el papel principal en esta respuesta, mientras que las polimerasas de TLS tienen una contribución muy minoritaria.

2. CONSECUENCIAS DEL DAÑO EN EL DNA CAUSADO POR EL MMS EN LA PROGRESIÓN DE LAS HORQUILLAS DE REPLICACIÓN

2.1. Rad5 es necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado

Los datos anteriores indican que Rad5 tiene un papel central en la tolerancia al daño en el DNA causado por el MMS durante la fase S, lo cual sugiere una importante función de esta proteína en la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el DNA. Estudios previos han mostrado que tras el tratamiento de células carentes de Rad5 con un pulso de MMS, seguido de un tiempo de recuperación en medio sin droga, los cromosomas, analizados por electroforesis en campo pulsado (PFGE), permanecían sensibles al calor *in vitro* (Karras y Jentsch, 2010; Minca y Kowalski, 2010), lo que sugiere una replicación incompleta del DNA. Sin embargo, la técnica de PFGE no permite estimar el alcance de los posibles defectos en la replicación, y no permite obtener información acerca de si o cómo la progresión de las horquillas de replicación se encuentra obstaculizada. De hecho, a pesar de los datos obtenidos por PFGE, se propuso que las células *rad5Δ* eran capaces de llevar a cabo sin retraso la replicación a través de DNA dañado por MMS (Karras y Jentsch, 2010). Para analizar de forma directa la replicación cromosómica en células carentes de Rad5, utilizamos un método basado en la sustitución de isótopos de densidad, que permite estudiar la síntesis de DNA en curso en un replicón específico, analizando el movimiento de las horquillas de replicación (McCarroll y Fangman, 1988; Reynolds *et al*, 1989; Tercero *et al*, 2000). De este modo analizamos la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado en células *rad5Δ*, comparándola con la de las células del tipo silvestre utilizadas como control y con la del mutante *tlsΔ*.

Se crecieron células silvestres, *tlsΔ* y *rad5Δ* en medio con isótopos pesados, se sincronizaron en G1 con factor α y se liberaron en medio con isótopos ligeros, en ausencia o presencia de MMS. Se siguió la replicación de seis fragmentos de restricción en un replicón de 70 kb del cromosoma VI (Tercero y Diffley, 2001), desde el origen de replicación temprano *ARS607* hasta el final del cromosoma. En las tres cepas, todos los fragmentos de DNA se encontraban en el pico HH (pesado-pesado, DNA no replicado) al principio del experimento, cuando las células estaban bloqueadas en G1 (Figuras R10A,

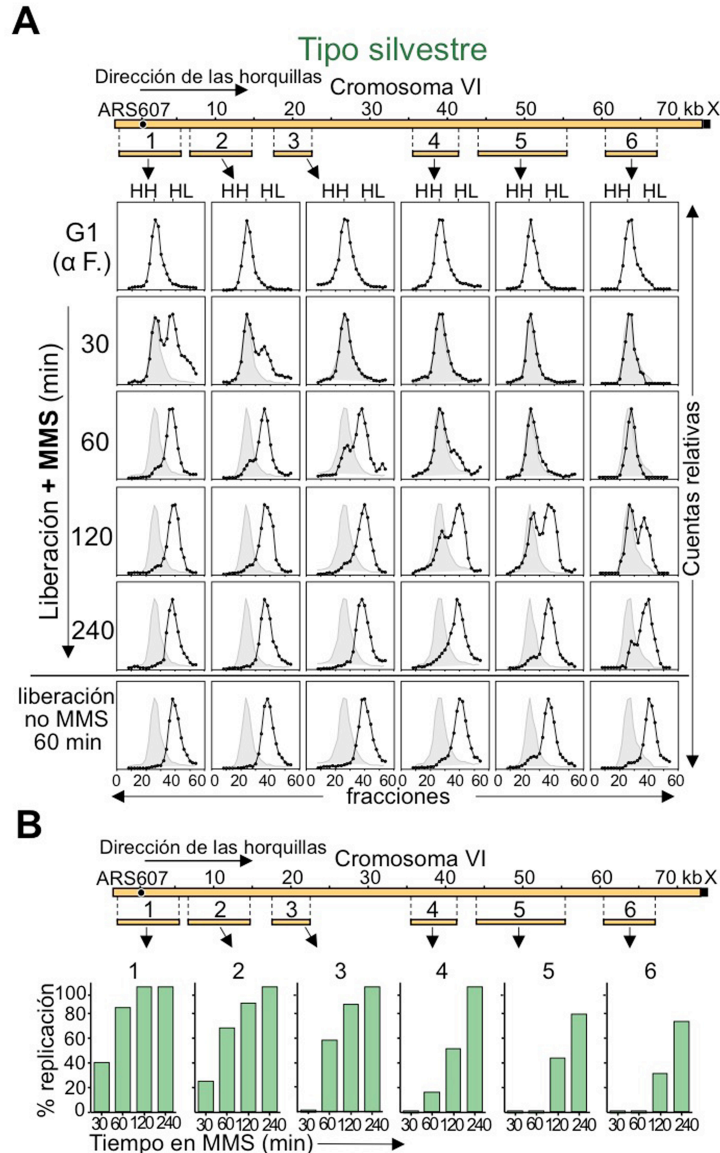


Figura R10. Progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS en células del tipo silvestre (TLS^+RAD5^+). El análisis de la progresión de las horquillas de replicación se llevó a cabo mediante la técnica de sustitución de isótopos de densidad. Para ello, se sincronizaron células control TLS^+RAD5^+ (cepa YMO13) en la fase G1 en medio con isótopos pesados y se liberaron después en medio con isótopos ligeros, tanto en presencia como en ausencia de MMS (0,033%). **(A)** La progresión de las horquillas de replicación se siguió en un replicón del cromosoma VI, utilizando sondas que reconocen los fragmentos 1-6. Los números de las sondas se corresponden con los números de los fragmentos. La cantidad relativa de radioactividad en el DNA hibridado se representa frente al número de fracción del gradiente. Se indica la posición de los picos de DNA no replicado (HH) y completamente replicado (HL). La posición del pico inicial HH (área gris) se muestra como comparación. **(B)** Cuantificación de la replicación en presencia de MMS de cada fragmento de DNA en cada tiempo analizado.

R11A y R12A, fila superior). En todos los casos, los fragmentos de DNA se habían desplazado al pico HL (pesado-ligero, DNA replicado) a los 60 min tras la liberación de G1 en medio sin MMS (Figuras R10A, R11A y R12A, fila inferior), lo que indica que

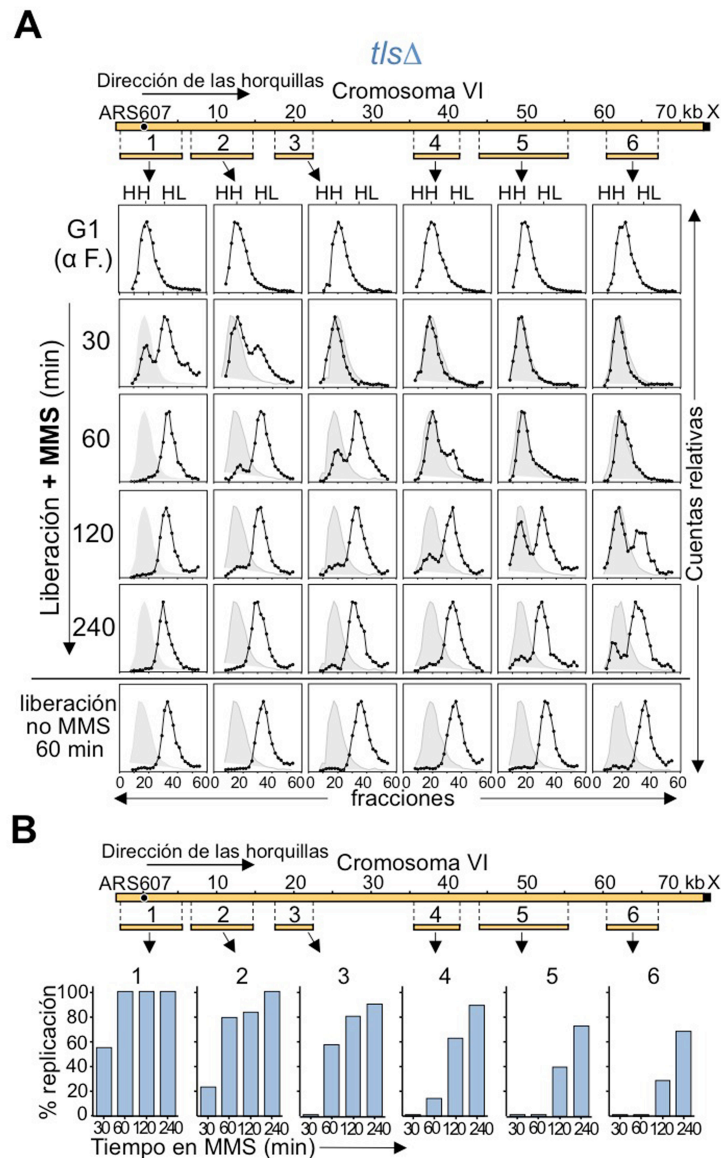


Figura R11. Progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS en células *t/sΔ*. Se sincronizaron células *t/sΔ* (cepa YMO27) en la fase G1 en medio con isótopos pesados y se liberaron después en medio con isótopos ligeros, tanto en presencia como en ausencia de MMS (0,033%). **(A)** La progresión de las horquillas de replicación se siguió en un replicón del cromosoma VI, utilizando sondas que reconocen los fragmentos 1-6. Los números de las sondas se corresponden con los números de los fragmentos. La cantidad relativa de radioactividad en el DNA hibridado se representa frente al número de fracción del gradiente. Se indica la posición de los picos de DNA no replicado (HH) y completamente replicado (HL). La posición del pico inicial HH (área gris) se muestra como comparación. **(B)** Cuantificación de la replicación en presencia de MMS de cada fragmento de DNA en cada tiempo analizado.

estaban replicados. Cuando las células del tipo silvestre se liberaron de G1 en medio con isótopos ligeros y MMS (Figura R10A), a los 30 min el fragmento 1 de DNA se había desplazado al pico HL, y ya se podía observar una fracción de DNA HL en el fragmento 2, lo que indica que la replicación había comenzado desde el origen *ARS607*. En la figura R16A podemos observar que la replicación del DNA avanzó de izquierda a derecha: el

fragmento 3 aparecía como DNA HL a los 60 min, y la replicación del resto de los fragmentos continuó de forma progresiva (la cuantificación de los datos de replicación se muestra en la Figura R10B). Así, como se había descrito previamente (Tercero y Diffley, 2001; Vazquez *et al*, 2008), las horquillas de replicación progresan lentamente a través de un DNA dañado, pero son capaces de replicar el replicón completo.

En las células *tlsΔ* (Figura R11), la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS fue muy similar a la del tipo silvestre, lo que está de acuerdo con los resultados mostrados en la Figura R5B. Como se muestra en la Figura 11A, la replicación se inició al igual que en las células control, ya que los fragmentos 1 y 2 se habían desplazado al pico HL a los 30 min. Las horquillas de replicación avanzaron de izquierda a derecha del replicón, despacio, pero eficientemente, y a los 240 min el replicón estaba prácticamente replicado. El porcentaje de replicación de cada fragmento de DNA en cada punto (Figura R11B) mostró que no había diferencias significativas entre el control y las células *tlsΔ*. Por consiguiente, las polimerasas de TLS no son necesarias para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS.

En el mutante *rad5Δ*, el fragmento 1 se había desplazado al pico HL a los 30 min tras la liberación de G1 en presencia de MMS (Figura R12A), indicando que el origen *ARS607* se activa con la misma eficiencia que en las células del tipo silvestre. Asimismo, ya se aprecia DNA replicado (HL) en el fragmento 2 en este punto. Las horquillas avanzaron despacio y la replicación progresó hacia la derecha, como indica el progresivo desplazamiento de los fragmentos de restricción hacia el pico HL. Sin embargo, se observaron notables diferencias entre las dinámicas de replicación de *rad5Δ* y de las células control. La figura R18A muestra que el porcentaje de DNA replicado (HL) de los fragmentos 2-6 a los 120 min era claramente inferior al del tipo silvestre (en la Figura R12B se muestran los datos cuantificados). A los 240 min, mientras la práctica totalidad del replicón se había replicado en células del tipo silvestre, una cantidad significativa de DNA permanecía sin replicar en los fragmentos 2-6 de la cepa *rad5Δ*. De hecho, solo el 30% de las horquillas consiguieron alcanzar el final del replicón en este mutante al final del experimento. Cabe remarcar, además, que el porcentaje de DNA replicado no aumentó a partir de los 60 min en los fragmentos 2 y 3 (alrededor del 65%), lo que indica que una fracción importante de las horquillas no pudieron pasar el final del fragmento 3. El tamaño medio de un replicón en *S. cerevisiae* es de 40 kb, por lo que, como media, las horquillas se desplazan unas 20 kb. Los datos anteriores permiten estimar que alrededor de un tercio de las horquillas terminan su progresión a menos de 20 kb del origen *ARS607* en las células *rad5Δ* tras 240 min de tratamiento con MMS. Por lo tanto, estos resultados indican que Rad5 es absolutamente necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS.

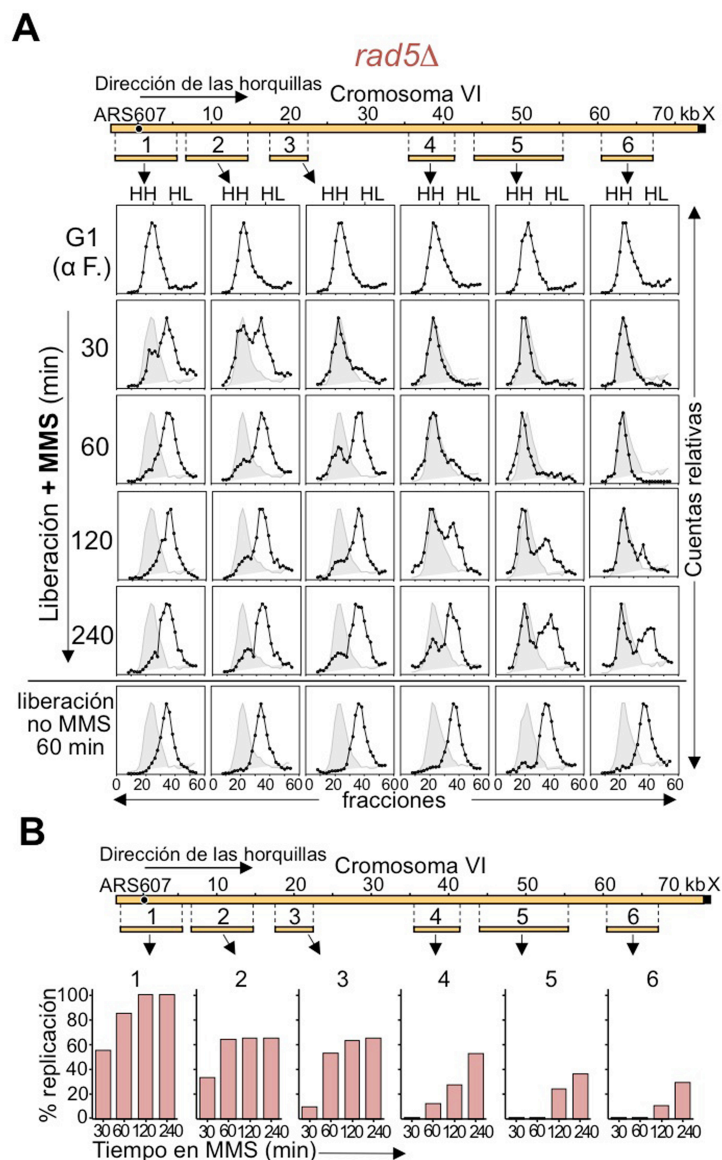


Figura R12. Rad5 es necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS. Se sincronizaron células *rad5Δ* (cepa YMO18) en la fase G1 en medio con isótopos pesados y se liberaron después en medio con isótopos ligeros, tanto en presencia como en ausencia de MMS (0,033%). **(A)** La progresión de las horquillas de replicación se siguió en un replicón del cromosoma VI, utilizando sondas que reconocen los fragmentos 1-6. Los números de las sondas se corresponden con los números de los fragmentos. La cantidad relativa de radioactividad en el DNA hibridado se representa frente al número de fracción del gradiente. Se indica la posición de los picos de DNA no replicado (HH) y completamente replicado (HL). La posición del pico inicial HH (área gris) se muestra como comparación. **(B)** Cuantificación de la replicación en presencia de MMS de cada fragmento de DNA en cada tiempo analizado.

Estos defectos pueden explicar además por qué las células *rad5Δ* muestran una gran pérdida de viabilidad al ser tratadas con MMS durante la fase S (Figura R8). Todos estos resultados muestran que, la rama libre de error de la ruta *RAD6-RAD18* de tolerancia al daño en el DNA, dependiente de Rad5, tiene un papel crucial facilitando la

replicación cromosómica a través de lesiones en el DNA. Estos datos sugieren también firmemente que Rad5 actúa de forma directa en las horquillas de replicación. Si esta proteína solo actuase por detrás de las horquillas, se originarían huecos o *gaps* en el DNA de las células *rad5Δ*, y estas moléculas híbridas de DNA discontinuas aparecerían como HL, incluso no habiéndose replicado por completo. Sin embargo, nosotros mostramos que solo un número reducido de horquillas llegan al final del replicón durante el transcurso del experimento, y que alrededor de un tercio de las mismas quedan bloqueadas dentro de la distancia que una horquilla recorre como media. Todo ello da lugar a DNA HH, que no puede contener *gaps* ya que está completamente no-replicado. En cualquier caso, estos datos no excluyen la posible existencia de *gaps* en el DNA que aparecerían como HL y no están, por tanto, en contra de la posibilidad de que Rad5 pueda actuar también por detrás de las horquillas de replicación.

3. ANÁLISIS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES DE Rad5 EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL DNA DURANTE LA FASE S

3.1. Las actividades E3 ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la respuesta al daño en el DNA inducido por MMS en la fase S

Rad5 es una proteína multifuncional que posee dos dominios funcionales bien caracterizados: un dominio *RING finger* de tipo C_3HC_4 , característico de ligasas de ubiquitina, y un dominio ATPasa/helicasa de la familia SWI/SNF en el cual se encuentra embebido el primero (Figura R13). El dominio *RING finger* es el responsable de la actividad E3 ubiquitina-ligasa de Rad5 y de su interacción con proteínas E2-conjugadoras de ubiquitina, y es necesario para la poliubiquitilación de PCNA (Ulrich y Jentsch, 2000).

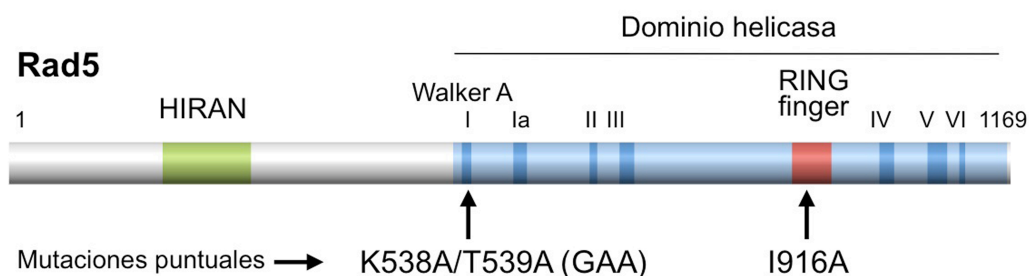


Figura R13. Esquema de la estructura conservada de dominios de Rad5. Se indican los sitios de las mutaciones puntuales empleadas en esta tesis. Los siete motivos helicasa característicos de la familia SWI/SNF2 de ATPasas dependientes de DNA están marcados con números romanos. En conjunto constituyen el dominio helicasa (sombreado azul). El dominio *RING-finger* se representa mediante un rectángulo rojo. En el extremo N-terminal se muestra, en verde, la ubicación del dominio HIRAN.

El dominio ATPasa/helicasa codifica una actividad ATPasa dependiente de DNA y media el papel de Rad5 en la reparación de DSB, así como su función helicasa especializada en la regresión de horquillas de replicación, al menos *in vitro* (Blastyak *et al*, 2007; Chen *et al*, 2005) (Figura R13).

Como los datos anteriores revelaban un papel clave de Rad5 en la respuesta celular a las lesiones en el DNA originadas por el tratamiento con MMS durante la fase S, nos preguntamos cuál era la contribución de cada una de las actividades descritas de Rad5 en esta respuesta. Para analizar esta cuestión, construimos estirpes que contenían versiones de Rad5 con mutaciones que eliminaban su actividad ubiquitina-ligasa (*rad5-I916A*) (Ulrich, 2003) o la actividad ATPasa (*rad5-K538A/T539A*, o *rad5-GAA*)

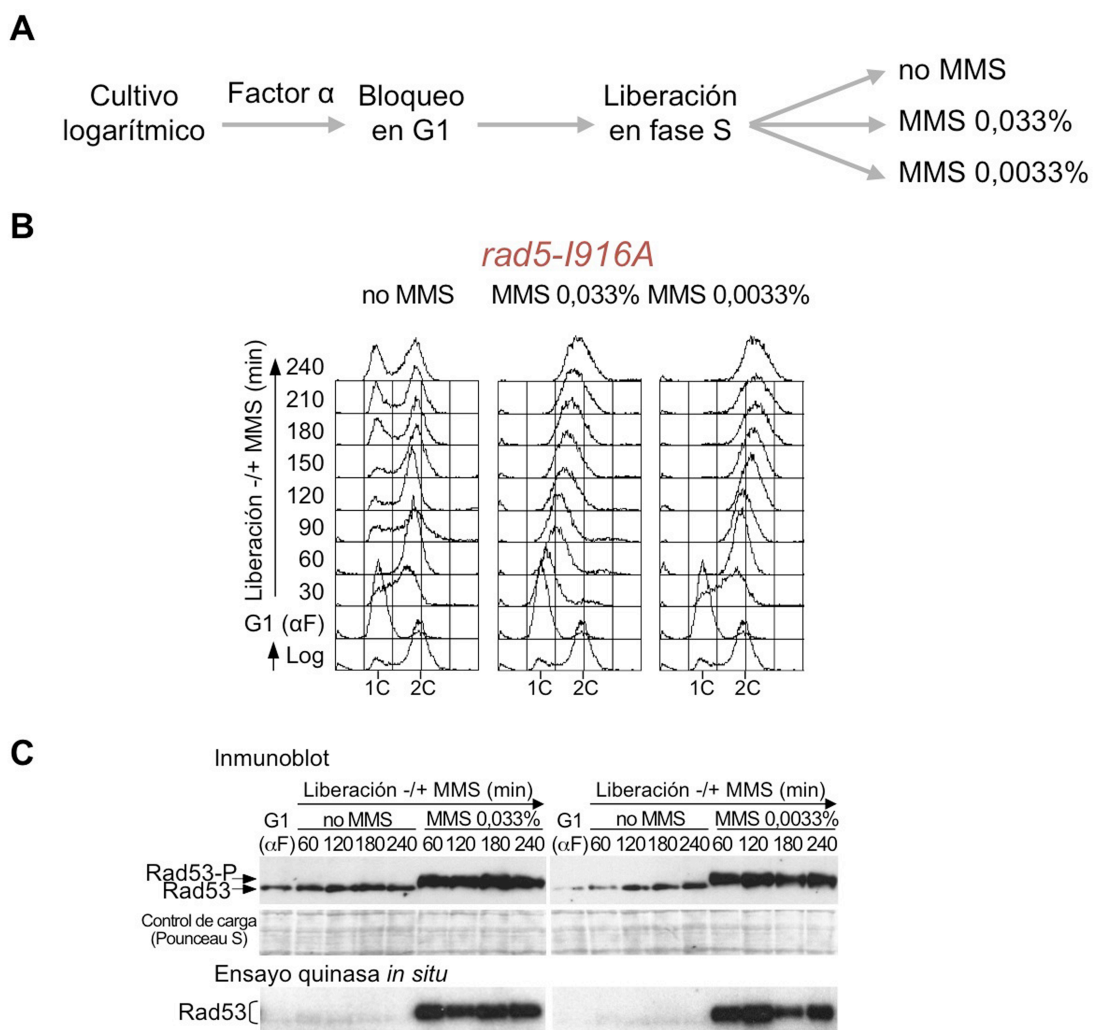


Figura R14. La actividad ubiquitina-ligasa de Rad5 es necesaria para la respuesta al daño en el DNA originado por el MMS durante la fase S. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *rad5-I916A* (cepa YMO60) en la fase G1 con factor α y se liberaron en medio sin o con MMS (0,033% o 0,0033%). (B) La progresión en el ciclo celular se siguió por citometría de flujo. (C) Inmunoblot y ensayo de autofosforilación *in situ* de Rad53.

(Chen *et al*, 2005) (Figura R13). A continuación estudiamos la progresión en el ciclo celular, la activación del *checkpoint* de la fase S y la viabilidad celular cuando se somete a estos mutantes al tratamiento con MMS durante una única fase S.

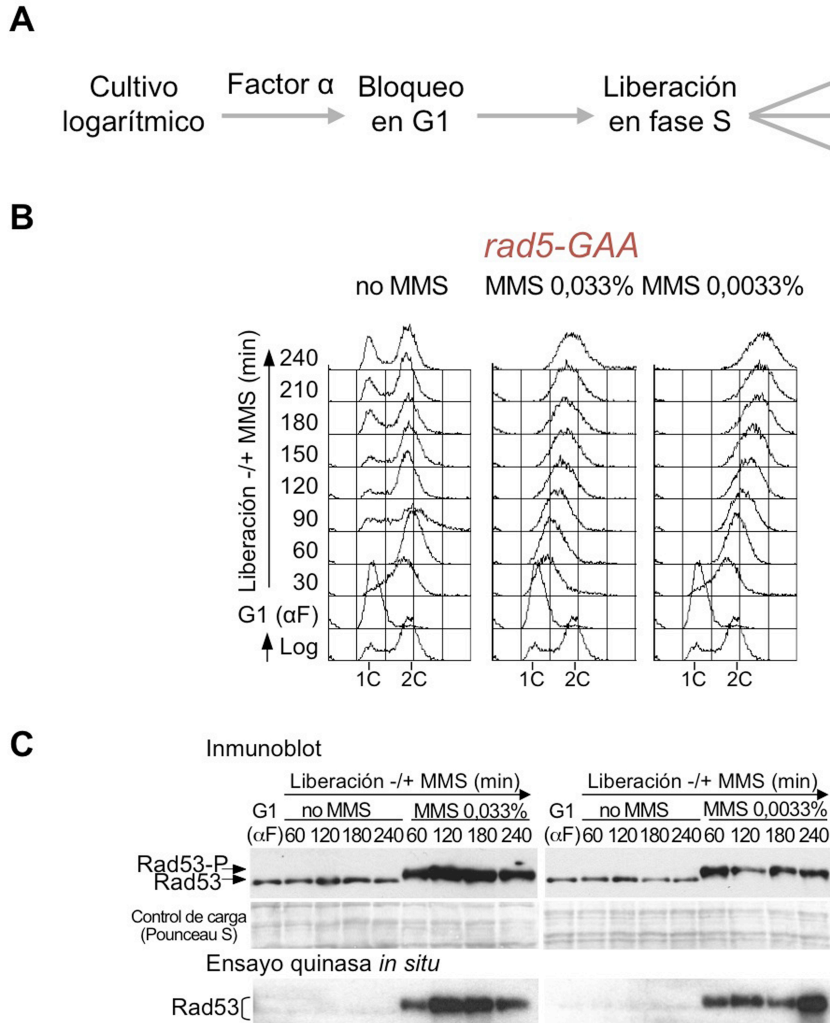


Figura R14. La actividad ATPasa/helicasa de Rad5 es necesaria para la respuesta al daño en el DNA originado por el MMS durante la fase S. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *rad5-GAA* (cepa YMO57) en la fase G1 con factor α y se liberaron en medio sin o con MMS (0,033% o 0,0033%). (B) La progresión en el ciclo celular se siguió por citometría de flujo. (C) Immunoblot y ensayo de autofosforilación *in situ* de Rad53.

Se sincronizaron en G1 células *rad5-I916A* y *rad5-GAA*, que a continuación se liberaron en la fase S en medio sin o con MMS (0,033 o 0,0033%) (Figura R14A y R15A). La citometría de flujo mostró que en ausencia de daño exógeno las células completaban la fase S y continuaban ciclando normalmente. En presencia de MMS (0,033%), tanto el mutante *rad5-I916A* como el *rad5-GAA* mostraron un retraso significativo en la progresión en la fase S en comparación con las células del tipo silvestre o las mutantes *t/sΔ* (Figura

R4B, panel izquierdo y central). De hecho, al igual que las células *rad5Δ* (Figura R4B, panel derecho), ninguno de los mutantes puntuales alcanzó el pico de contenido en DNA 2C durante el curso del experimento (Figura R14B y R15B). Es más, cuando las células se liberaron en medio con MMS al 0,0033%, dosis que no causó ningún efecto en las células control o *tlsΔ* (Figura R5B, panel izquierdo y central), los mutantes *rad5-I916* (Figura R14B) y *rad5-GAA* (Figura R15B) no pudieron progresar en el ciclo celular y, al igual que las células *rad5Δ* (Figura R5B, panel derecho), permanecieron bloqueados con un contenido de DNA 2C, incluso 240 min después de la liberación de G1. Tanto en las células *rad5-I916A* (Figura R14C) como en las *rad5-GAA* (Figura R15C) el *checkpoint* de la fase S se activó, como cabía esperar, tras el tratamiento con MMS al 0,033%, como muestra la fosforilación de Rad53 y la adquisición de actividad quinasa por parte de dicha proteína. Cabe destacar que Rad53 también se activó al tratar los mutantes puntuales de *RAD5* con la dosis baja de MMS de 0,0033% (Figura R14C y R15C), al igual que en las células *rad5Δ* y a diferencia del tipo silvestre o de *tlsΔ* (Figura R5C).

3.2. Ubc13 es necesaria para la respuesta al daño en el DNA inducido por MMS en la fase S

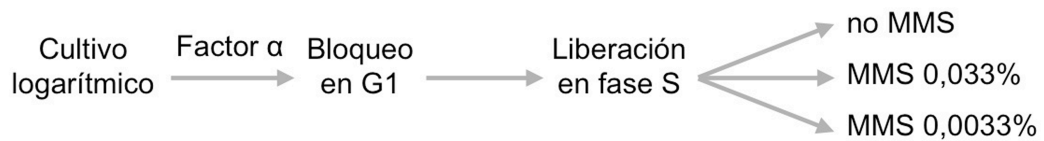
Los resultados del apartado anterior muestran que la actividad ubiquitina-ligasa de Rad5 es necesaria para la respuesta celular al MMS, y por tanto debe serlo la poliubiquitilación de PCNA. Para que se produzca esta modificación se requiere, además de la actividad ubiquitina-ligasa de Rad5, el complejo E2 conjugador de ubiquitina Ubc13/Mms2. Para confirmar que la poliubiquitilación de PCNA es necesaria durante la replicación cromosómica en presencia de daño en el DNA causado por alquilación, realizamos los experimentos anteriormente descritos (Figura R14 y R15) en una cepa *ubc13Δ* en la que se ha delecionado el gen que codifica la proteína E2-conjugadora de ubiquitina Ubc13.

Se sincronizaron en G1 células *ubc13Δ*, que a continuación se liberaron en la fase S en medio sin o con MMS (0,033 o 0,0033%) (Figura R16A). La citometría de flujo mostró que en ausencia de daño exógeno las células completaban la fase S y continuaban ciclando normalmente. En presencia de MMS (0,033%), las células *ubc13Δ* mostraron un retraso significativo en la progresión en la fase S en comparación con las células del tipo silvestre o las mutantes *tlsΔ* (Figura R4B, panel izquierdo y central). Al igual que las células *rad5Δ*, *rad5-I916A* y *rad5-GAA* (Figuras R4B panel derecho, R14B y R15B), ninguno de los mutantes puntuales alcanzó el pico de contenido en DNA 2C durante el curso del experimento (Figura R16B).

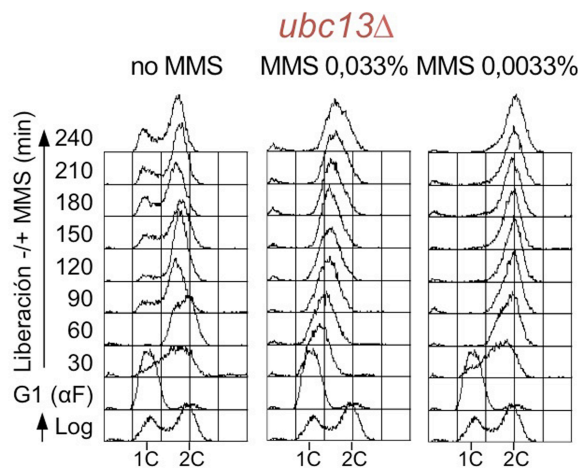
De nuevo, cuando las células se liberaron en medio con MMS al 0,0033%, dosis que no causó ningún efecto en las células control o *tlsΔ* (Figura R5B, panel izquierdo y

central), el mutante *ubc13Δ*, al igual que los mutantes *rad5Δ*, *rad5-1916*, y *rad5-GAA* (Figura R5B panel derecho, R14B y R15B) no pudieron progresar en el ciclo celular y permanecieron bloqueados con un contenido de DNA 2C hasta el final del experimento. En el mutante *ubc13Δ* el *checkpoint* de la fase S se activó de manera normal tras el tratamiento con MMS al 0,033%, como muestra la fosforilación de Rad53 y la adquisición de actividad quinasa por parte de esta proteína (Figura 16C). Rad53 también se activó durante el tratamiento de las células con la dosis baja de MMS de 0,0033% (Figura R16C), al igual que en las células *rad5Δ*, *rad5-1916*, y *rad5-GAA* y a diferencia del tipo silvestre o el mutante *tsΔ* (Figura R5C, R14C y R15C).

A



B



C

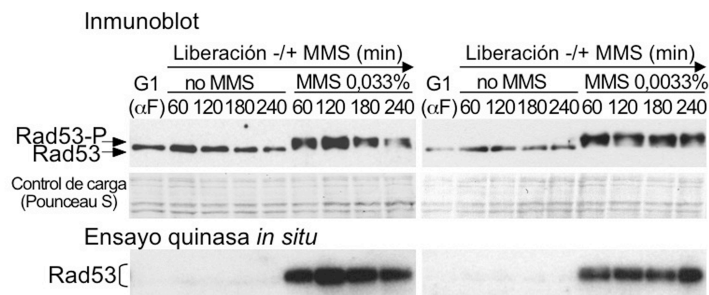


Figura R16. Ubc13 es necesaria para la respuesta al daño en el DNA originado por el MMS durante la fase S. (A) Esquema del experimento. Se sincronizaron células *ubc13Δ* (cepa YMO29) en la fase G1 con factor α y se liberaron en medio sin o con MMS (0,033% o 0,0033%). (B) La progresión en el ciclo celular se siguió por citometría de flujo. (C) Inmunoblot y ensayo de autofosforilación *in situ* de Rad53.

Estos resultados muestran que ambas actividades, E3 ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa, son importantes para la función de Rad5 en la respuesta a la presencia de daño en el DNA durante la fase S, y que la pérdida de cualquiera de ellas agrava los efectos de la exposición a una baja dosis de MMS que es inocua para las células con Rad5 funcional (Figura R5B y C panel izquierdo). Del mismo modo, tanto la carencia de la actividad ubiquitina-ligasa de Rad5 como la ausencia de la enzima E2 conjugadora Ubc13 muestran que la poliubiquitilación de PCNA es necesaria para la respuesta celular al daño causado por MMS

3.3. Viabilidad de los mutantes puntuales de *RAD5* tras el tratamiento con distintas dosis de MMS durante la fase S

A continuación, estudiamos la viabilidad de los mutantes puntuales de *RAD5* tras la exposición a MMS durante la fase S, usando una serie de concentraciones de la droga. Como muestra la Figura R17, tanto el mutante *rad5-I916A* como el *rad5-GAA* sufren una importante pérdida de viabilidad tras el tratamiento con MMS durante la fase S, en comparación con la cepa isogénica *RAD5*⁺ utilizada como control.

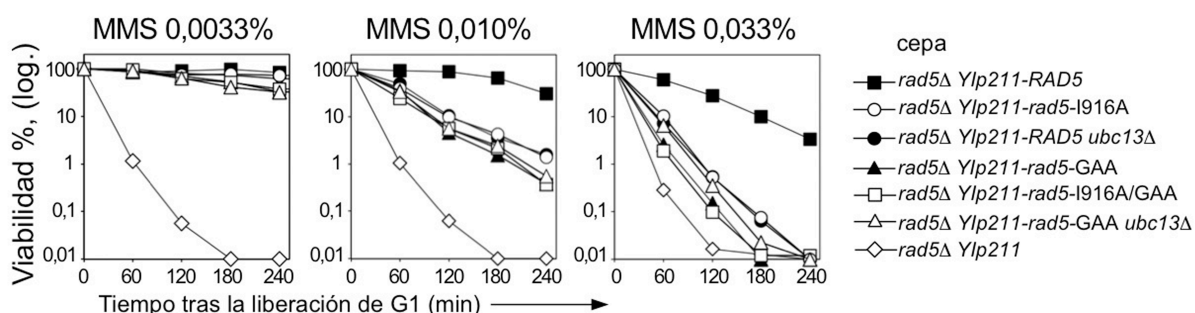


Figura R17. Las actividades ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la viabilidad de las células tratadas con MMS durante la fase S. Se sincronizaron las células de las distintas cepas en la fase G1 con factor α , y se liberaron posteriormente en la fase S en medio fresco con distintas concentraciones de MMS. La viabilidad celular se estimó a los tiempos indicados mediante el recuento de unidades formadoras de colonias. Las cepas utilizadas, todas ellas isogénicas, fueron: *RAD5*⁺ control (cepa YMO56); *rad5-I916A* (cepa YMO60); *ubc13Δ* (cepa YMO69); *rad5-GAA* (cepa YMO57); *rad5-I916A/GAA* (cepa YMO63); *rad5-GAA ubc13Δ* (cepa YMO71); *rad5Δ* control (cepa YMO55).

En coherencia con los resultados anteriores, la viabilidad de una estirpe isogénica *ubc13Δ*, también necesaria para la poliubiquitilación de PCNA, fue muy similar a la de *rad5-I916A*. Estos resultados apoyan la conclusión anterior de que tanto la actividad ubiquitina ligasa como la ATPasa/helicasa son necesarias para la tolerancia a las lesiones causadas por MMS. Sin embargo, la caída de la viabilidad en estos mutantes puntuales de *RAD5* no fue tan extrema como la de las células *rad5Δ* (Figura R8). Para

intentar explicar estas diferencias, analizamos si ambas actividades se comportaban de forma sinérgica, para lo cual construimos un doble mutante *rad5-I916A/GAA* y estimamos la viabilidad de esta cepa utilizando las mismas condiciones empleadas anteriormente. Los datos obtenidos (Figura R17) indicaron que las células *rad5-I916A/GAA* no mostraron un aumento de la sensibilidad al tratamiento con las distintas dosis de MMS en comparación con el más sensible de los mutantes puntuales, *rad5-GAA*. De acuerdo con los datos anteriores, la sensibilidad al MMS de una estirpe *rad5-GAAubc13Δ* también fue similar a la de las células *rad5-I916A/GAA*. Por lo tanto, al menos para la respuesta al tratamiento con MMS, los mutantes *rad5-I916A* y *rad5-GAA* son epistáticos. No es este el caso con todos los agentes que causan daño en el DNA, ya que cuando las células se tratan con adocolesina, el doble mutante *rad5-I916A/GAA* es más sensible a esta droga que los mutantes individuales (Minca y Kowalski, 2010). Es destacable también que las células *rad5-I916A/GAA* no mostraron tanta sensibilidad al tratamiento con MMS como el mutante *rad5Δ* empleado como control (Figura R17), lo cual se explicaría por la existencia de funciones adicionales de Rad5 en la tolerancia al daño en el DNA. A este respecto, se ha demostrado que Rad5 controla algunos procesos de TLS de manera independiente de sus actividades ubiquitina-ligasa o helicasa, probablemente mediante un papel estructural (Coulon *et al*, 2010; Gangavarapu *et al*, 2006; Halas *et al*, 2011; Kuang *et al*, 2013; Pages *et al*, 2008). Además, se sabe que las proteínas homólogas humanas de Rad5, HLF y SHPRH, promueven el reclutamiento de la polimerasa de TLS más apropiada al sitio de la lesión (Lin *et al*, 2011).

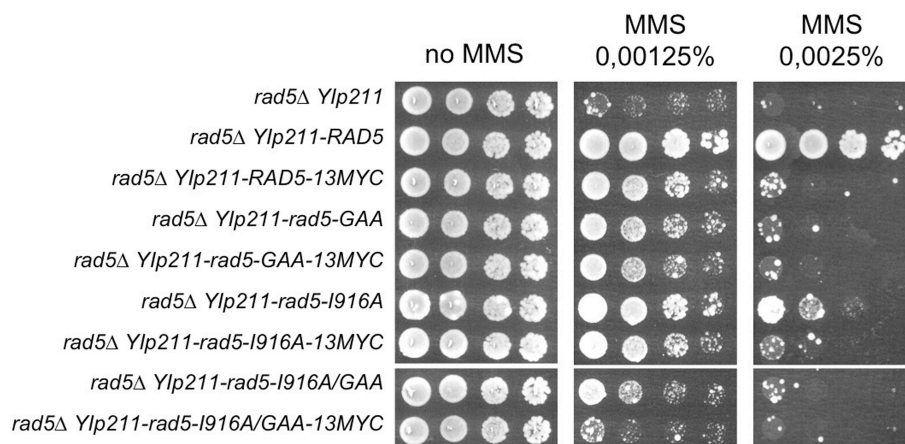
3.4. Las proteínas mutantes de Rad5 se expresan al mismo nivel que la proteína silvestre

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los mutantes puntuales de *RAD5*, nos planteamos la posibilidad de que los efectos observados se debiesen a que en dichas estirpes hubiese una menor cantidad de la proteína Rad5 con respecto al control del tipo silvestre. Para excluir esta posibilidad, analizamos si las proteínas mutantes son inestables, o si se expresan en mucha menor medida que la proteína silvestre, como se ha sugerido anteriormente para Rad5-GAA (Chen *et al*, 2005).

Para realizar este análisis, construimos estirpes en las que etiquetamos cada una de las versiones de Rad5 con un epítipo 13Myc y comparamos la sensibilidad al MMS y la cantidad de esta proteína en dichas cepas (Figura R18). En un ensayo de sensibilidad en gotas (Figura R18A) observamos que, en todas las cepas, la sensibilidad es algo inferior con respecto a la versión no etiquetada. Sin embargo, aun siendo más sensibles en conjunto, estas cepas mantienen las mismas sensibilidades relativas entre sí, y tanto los mutantes de cada actividad de Rad5 como el doble mutante muestran una

sensibilidad similar al tratamiento con MMS. Por inmunoblot (Figura R18B) podemos apreciar además que Rad5-GAA no es una proteína inestable, como se había propuesto (Chen *et al*, 2005), y que se encuentra en la célula en niveles comparables a las de las otras versiones de Rad5 o de la proteína silvestre.

A



B

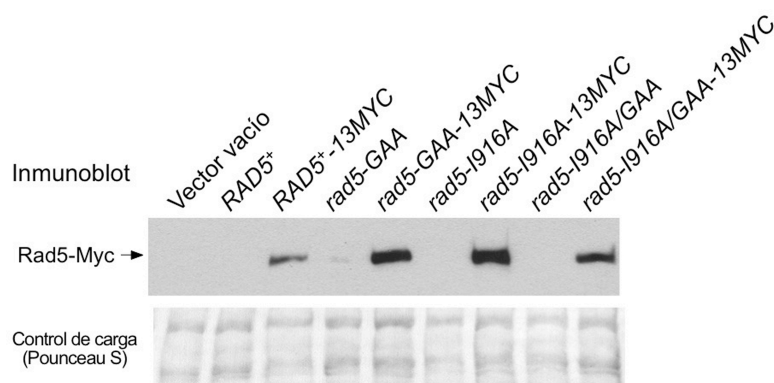


Figura R18. Análisis de los mutantes puntuales de Rad5 etiquetados con 13Myc. (A) Ensayo de viabilidad en gota de cada mutante de Rad5 y de su versión etiquetada con el epítipo Myc. (B) Inmunoblot mostrando la expresión de Rad5 en las cepas anteriores. Las cepas utilizadas, todas ellas isogénicas, fueron: *rad5Δ* control (cepa YMO55); *RAD5⁺* control (cepa YMO56); *RAD5-13MYC* (cepa YMO64); *rad5-GAA* (cepa YMO57); *rad5-GAA-13MYC* (cepa YMO65); *rad5-I916A* (cepa YMO60); *rad5-I916A-13MYC* (cepa YMO66); *rad5-I916A/GAA* (cepa YMO63); *rad5-I916A/GAA-13MYC* (cepa YMO67).

Estas observaciones validan, por tanto, los resultados obtenidos en el apartado anterior, en el que además utilizamos las versiones no etiquetadas de cada una de las proteínas mutantes que estábamos analizando, de modo que no se sumase la pequeña pérdida de viabilidad que muestran las células con estas proteínas de fusión al efecto causado por el MMS. Por tanto, la sensibilidad al daño en el DNA de los mutantes puntuales de *RAD5* que observamos en nuestros experimentos se debe a la carencia de las actividades E3 ubiquitina-ligasa o ATPasa/helicasa y no a la inestabilidad o a una menor cantidad de las proteínas mutantes de Rad5 en la célula.

3.5. La progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado es defectiva en ausencia de las actividades catalíticas de Rad5

Dada la importancia de Rad5 para la progresión de las horquillas de replicación que se muestra en este trabajo (Figura R12), decidimos analizar cuál era la contribución

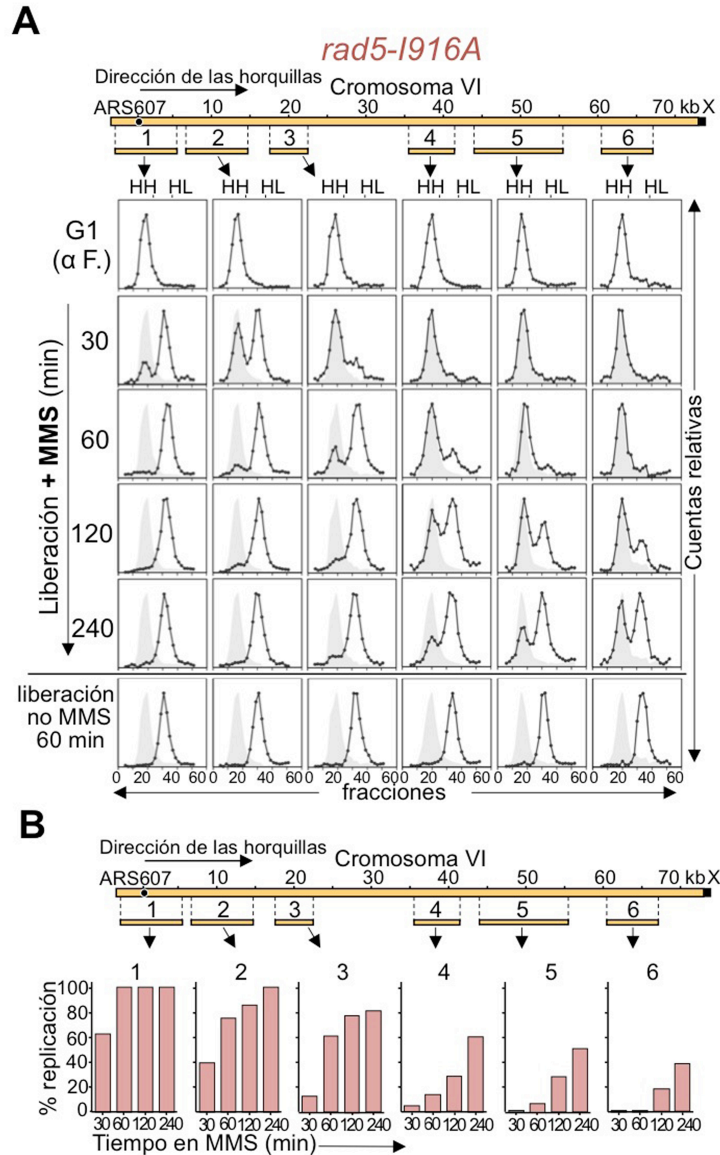


Figura R19. La progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS es defectiva en ausencia de la actividad ubiquitina-ligasa de Rad5. Se sincronizaron células *rad5-1916A* (cepa YMO97) en la fase G1 en medio con isótopos pesados y se liberaron después en medio con isótopos ligeros, tanto en presencia como en ausencia de MMS (0,033%). **(A)** La progresión de las horquillas de replicación se siguió en un replicón del cromosoma VI, utilizando sondas que reconocen los fragmentos 1-6. Los números de las sondas se corresponden con los números de los fragmentos. La cantidad relativa de radioactividad en el DNA hibridado se representa frente al número de fracción del gradiente. Se indica la posición de los picos de DNA no replicado (HH) y completamente replicado (HL). La posición del pico inicial HH (área gris) se muestra como comparación. **(B)** Cuantificación de la replicación en presencia de MMS de cada fragmento de DNA en cada tiempo analizado.

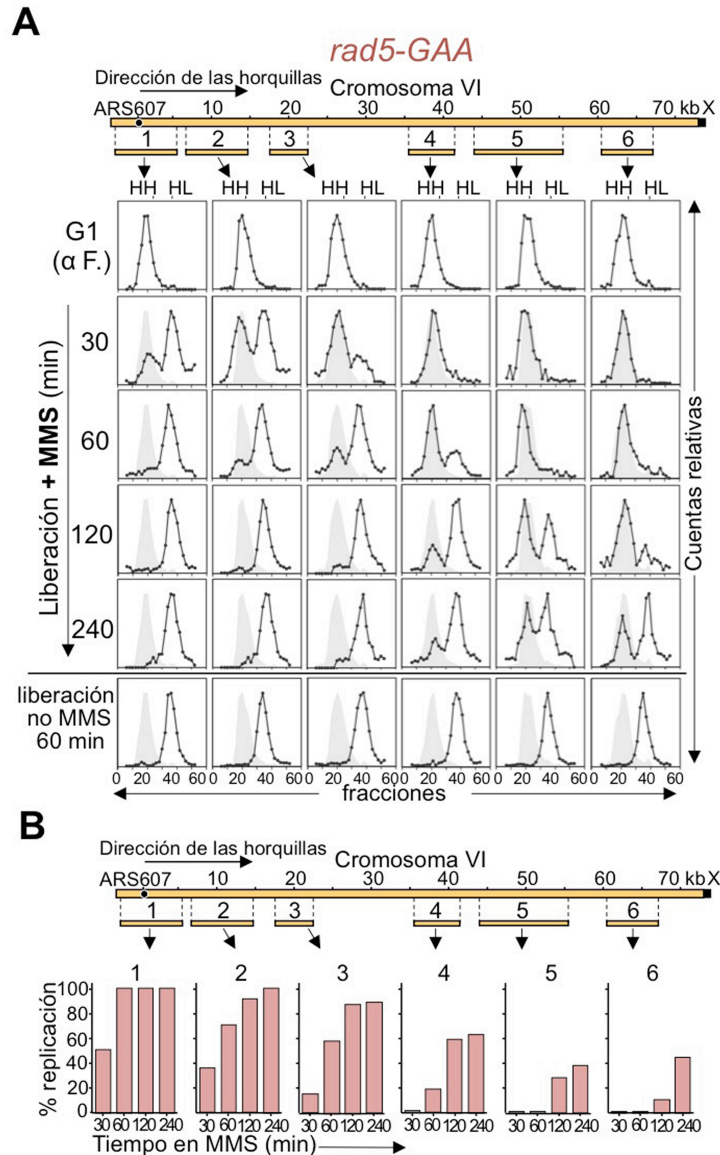


Figura R20. La progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS es defectiva en ausencia de la actividad ATPasa/helicasa de Rad5. Se sincronizaron células *rad5-GAA* (cepa YMO96) en la fase G1 en medio con isótopos pesados y se liberaron después en medio con isótopos ligeros, tanto en presencia como en ausencia de MMS (0,033%). **(A)** La progresión de las horquillas de replicación se siguió en un replicón del cromosoma VI, utilizando sondas que reconocen los fragmentos 1-6. Los números de las sondas se corresponden con los números de los fragmentos. La cantidad relativa de radioactividad en el DNA hibridado se representa frente al número de fracción del gradiente. Se indica la posición de los picos de DNA no replicado (HH) y completamente replicado (HL). La posición del pico inicial HH (área gris) se muestra como comparación. **(B)** Cuantificación de la replicación en presencia de MMS de cada fragmento de DNA en cada tiempo analizado.

de cada una de las actividades descritas de Rad5, así como la de Ubc13 en este proceso. Para ello, realizamos experimentos de sustitución de isótopos de densidad con los mutantes puntuales de Rad5 que carecen de las actividades ubiquitina-ligasa o ATPasa/helicasa de Rad5, así como con el mutante de delección *ubc13Δ*.

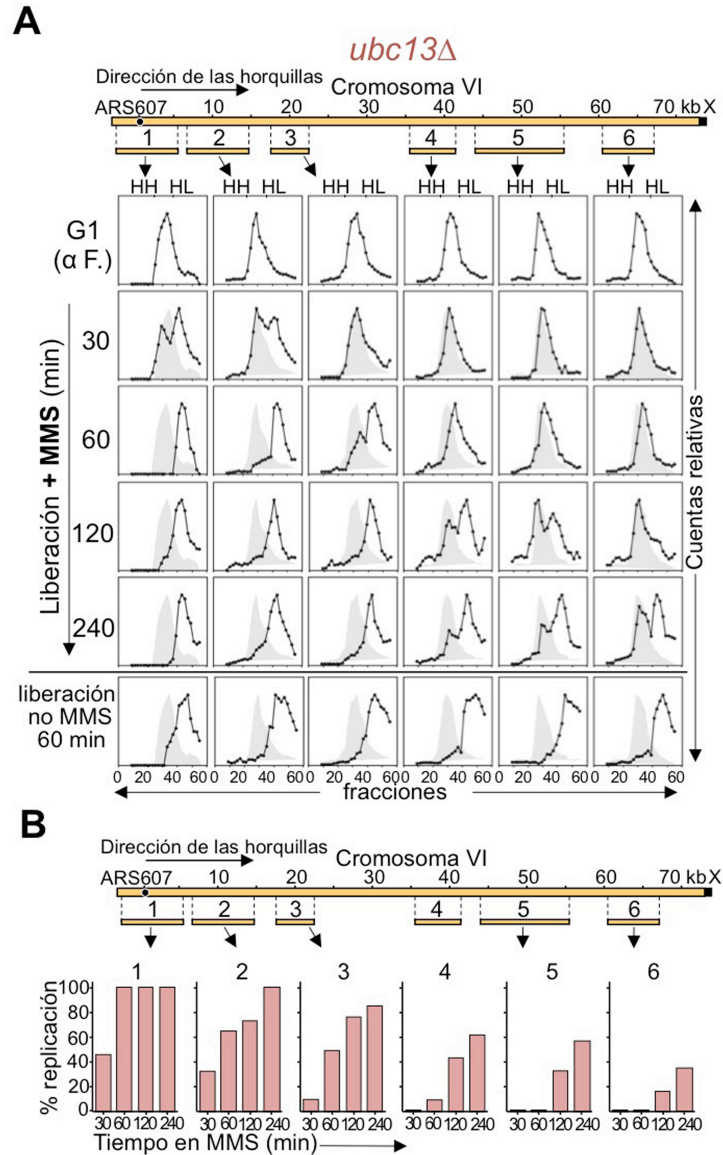


Figura R21. La progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS es defectiva en ausencia de Ubc13. Se sincronizaron células *ubc13Δ* (cepa YMO29) en la fase G1 en medio con isótopos pesados y se liberaron después en medio con isótopos ligeros, tanto en presencia como en ausencia de MMS (0,033%). **(A)** La progresión de las horquillas de replicación se siguió en un replicón del cromosoma VI, utilizando sondas que reconocen los fragmentos 1-6. Los números de las sondas se corresponden con los números de los fragmentos. La cantidad relativa de radioactividad en el DNA hibridado se representa frente al número de fracción del gradiente. Se indica la posición de los picos de DNA no replicado (HH) y completamente replicado (HL). La posición del pico inicial HH (área gris) se muestra como comparación. **(B)** Cuantificación de la replicación en presencia de MMS de cada fragmento de DNA en cada tiempo analizado.

En los tres mutantes *rad5-1916A*, *rad5-GAA* y *ubc13Δ*, todos los fragmentos de DNA se encontraban en el pico HH (pesado-pesado, DNA no replicado) al principio del experimento, cuando las células estaban bloqueadas en G1 (Figuras R19A y R20A, fila superior). En las tres estirpes, todos los fragmentos de DNA se habían desplazado al pico

HL (pesado-ligero, DNA replicado), a los 60 min tras la liberación de G1 en medio sin MMS (Figuras R19A, R20A y R21A, fila inferior) lo que indica que estaban replicados. Cuando las células *rad5-1916A*, *rad5-GAA* y *ubc13Δ* se liberaron en la fase S en presencia de MMS, el origen de replicación ARS607 se activó de forma similar al de las células silvestres, *tlsΔ* y *rad5Δ* (Figuras R16A, R17A y R18A), ya que a los 30 min el fragmento 1 se había desplazado al pico HL y ya se podía observar DNA replicado (HL) en los fragmentos 2 y 3 (Figuras R19A, R20A y R21A). En las figuras R19A, R20A y R21A podemos observar el progresivo desplazamiento de los fragmentos de restricción hacia el pico HL, mostrando que las horquillas avanzaron despacio y que la replicación progresó de izquierda a derecha.

Los resultados obtenidos indicaron que, a pesar del avance de las horquillas de replicación, esta progresión era defectuosa en los tres casos por comparación con las células del tipo silvestre analizadas bajo las mismas condiciones experimentales (Figura R10A). Así, mientras que en las células control el replicón estaba prácticamente replicado a los 240 min (Figura 10A), alrededor del 40% de las horquillas no habían pasado el fragmento 4 en este punto del experimento en ninguno de los tres mutantes (Figuras R19, R20 y R21). Asimismo, solo un 44% de las horquillas llegaron al final del replicón durante el curso del experimento en las células mutantes *rad5-GAA* (Figura R20), y solo un 35% lo hicieron en los mutantes *rad5-1916A* y *ubc13Δ*, cuyo comportamiento fue muy similar (Figuras R19 y R21). Estos datos indican que las actividades ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son importantes para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS. No obstante, el defecto en la replicación encontrado en los mutantes puntuales de *RAD5* no es tan acusado como el obtenido con *rad5Δ* (Figura R12), lo que está de acuerdo con las diferencias existentes entre estos mutantes en cuanto a la sensibilidad al tratamiento con MMS durante la fase S (Figura R17).

4. REGULACIÓN DE Rad5

4.1. Rad5 se encuentra regulada en el ciclo celular y alcanza niveles máximos en la fase S

A continuación investigamos si Rad5 mostraba algún tipo de regulación que pudiese contribuir a comprender su función en la replicación de los cromosomas dañados por MMS. En primer lugar analizamos los niveles de la proteína en el ciclo celular. Para ello utilizamos una versión de Rad5 etiquetada en el extremo C-terminal con el epítipo HA, expresada desde el propio promotor de *RAD5* en su *locus* genómico.

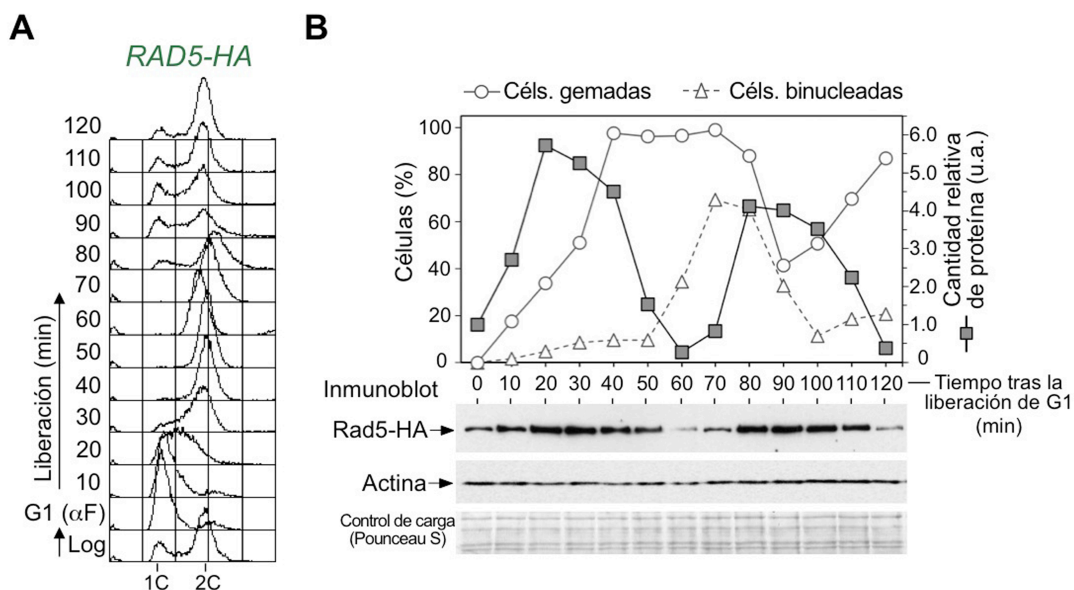


Figura R22. Regulación en el ciclo celular de Rad5. (A) Se sincronizaron células *RAD5-HA* (cepa YMO52) en la fase G1 con factor α y a continuación se liberaron en medio fresco. La progresión en el ciclo celular se analizó por citometría de flujo. (B) Representación gráfica del porcentaje de células gemadas y binucleadas a lo largo del experimento. El inmunoblot que aparece debajo muestra los niveles de Rad5 a los mismos tiempos que en la gráfica. Como controles de carga se utilizaron un inmunoblot para la detección de actina y la tinción de la membrana con Ponceau S. Las cantidades relativas (unidades arbitrarias, u.a.) de la proteína Rad5-HA se representan en la gráfica para cada punto del experimento.

Se sincronizaron células *RAD5-HA* en la fase G1 con factor α . A continuación se liberaron en medio fresco y se les permitió progresar a lo largo del ciclo celular. La progresión en el ciclo celular se monitorizó por citometría de flujo (Figura R22A), así como por la estimación del porcentaje de células gemadas y binucleadas en el cultivo (Figura R22B). A los tiempos indicados se recogieron células para la extracción de proteínas, que se analizaron por inmunoblot (Figura R22B). Este análisis reveló oscilaciones significativas de los niveles de Rad5 a lo largo del ciclo celular. Así, Rad5 alcanzó sus niveles máximos a los 20-30 min desde la liberación del bloqueo en G1, indicando un claro pico de expresión de la proteína al principio o mitad de la fase S. Los niveles de proteína decayeron considerablemente a continuación, alcanzando un mínimo al final de la fase S o principio de la mitosis (50-70 min después de G1), para volver a aumentar durante la fase S del segundo ciclo (alrededor de los 90 min) hasta un máximo similar al anterior (Figura R22B). La cuantificación relativa de los niveles de la proteína en cada punto del experimento se muestra en el gráfico de la Figura R22B.

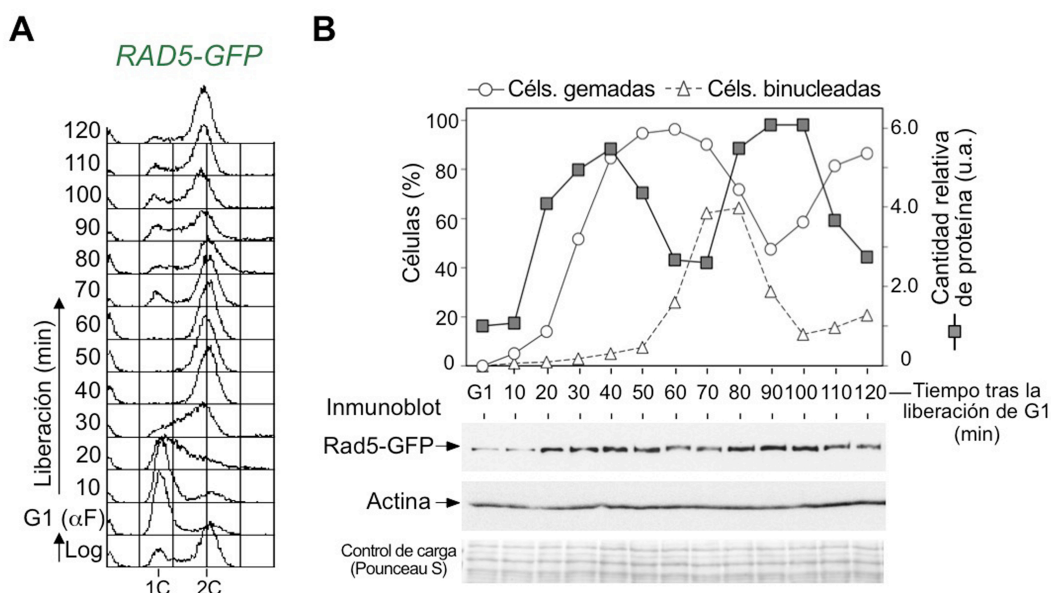


Figura R23. Regulación en el ciclo celular de Rad5. (A) Se sincronizaron células *RAD5-GFP* (cepa YMO37) en la fase G1 con factor α y a continuación se liberaron en medio fresco. La progresión del ciclo celular se analizó por citometría de flujo. (B) Representación gráfica del porcentaje de células gemadas y binucleadas a lo largo del experimento. El inmunoblot que aparece debajo los niveles de Rad5 a los mismos tiempos que en la gráfica. Como controles de carga se utilizaron un inmunoblot para la detección de actina y la tinción de la membrana con Ponceau S. Las cantidades relativas (unidades arbitrarias, u.a.) de la proteína Rad5-GFP se representan en la gráfica para cada punto del experimento.

Para descartar la posibilidad de que las oscilaciones observadas fuesen simplemente debidas al epítipo utilizado para la identificación de la proteína, llevamos a cabo los mismo experimentos con otra versión etiquetada de Rad5, Rad5-GFP. El resultado fue muy similar al obtenido con Rad5-HA (Figura R23), por lo que descartamos que las variaciones en los niveles proteicos encontradas en estos experimentos fueran debidas al uso de la proteína de fusión. Estos resultados muestran que la expresión de Rad5 varía a lo largo del ciclo celular y muestra los mayores niveles durante la fase S. Este modo de regulación sugiere firmemente que Rad5 actúa de forma predominante durante la fase S, lo cual estaría de acuerdo con el papel de esta proteína en la respuesta celular al daño en el DNA que hemos encontrado en este trabajo, que permite la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el material genético.

4.2. Los niveles de Rad5 no están regulados en respuesta al daño en el DNA

Como Rad5 es necesaria para hacer frente a las lesiones en el DNA durante la replicación cromosómica, nos preguntamos si, además de la regulación que se observa en un ciclo celular en ausencia de daño exógeno, esta proteína podría estar regulada adicionalmente cuando las células sufren daño en el DNA.

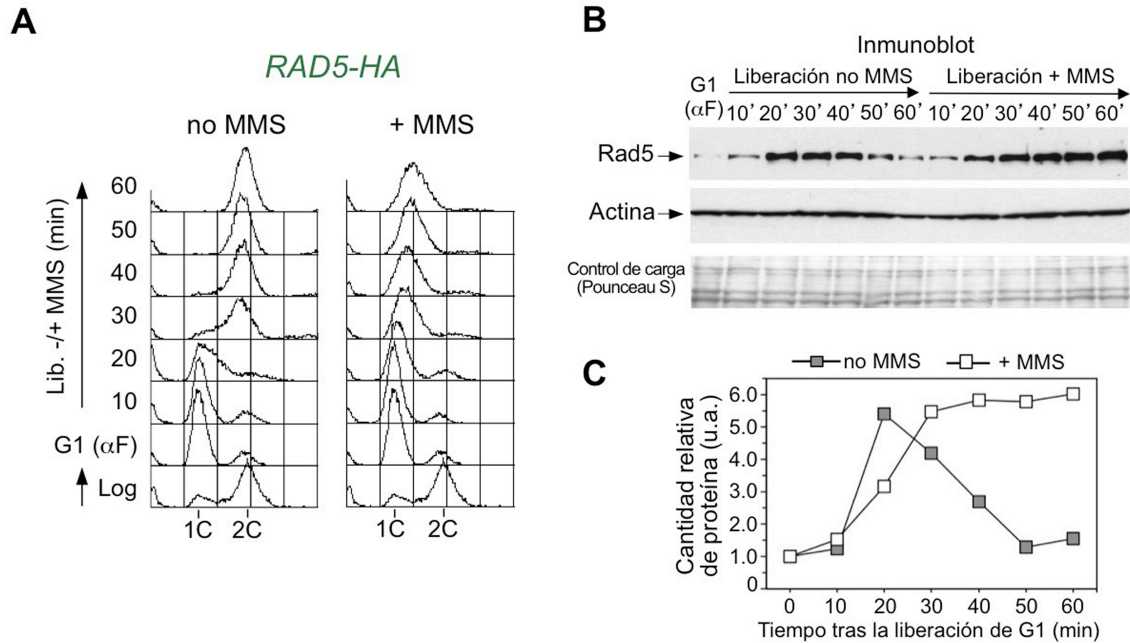


Figura R24. Los niveles de Rad5 no se modifican cuando el DNA está dañado. Se bloquearon células *RAD5-HA* (cepa YMO52) en la fase G1 utilizando factor α y a continuación se liberaron en medio sin o con MMS (0,033%). **(A)** La progresión en el ciclo celular se analizó mediante citometría de flujo **(B)** Análisis de los niveles de la proteína Rad5 por inmunoblot. Como controles de carga se utilizaron un inmunoblot para la detección de actina y la tinción de la membrana con Ponceau S. **(C)** Representación gráfica de la cantidad relativa de proteína a lo largo del experimento (unidades arbitrarias, u.a.).

Para estudiar esta cuestión, analizamos en primer lugar los niveles de Rad5 tras un tratamiento con MMS durante la fase S. Para ello, sincronizamos células *RAD5-HA* en G1 y las liberamos en fase S en medio sin o con MMS (Figura R24A). Al liberar las células en medio sin droga, Rad5 mostró las oscilaciones descritas anteriormente (Figura R22B), con un pico de expresión durante la fase S y niveles mínimos tras acabar la misma y en G1 (Figura R24B). Cuando las células se liberaron en medio con MMS, Rad5 mostró niveles máximos similares a los alcanzados en ausencia de daño en el DNA. Estos niveles de proteína se mantuvieron durante el experimento debido a la prolongada fase S causada por la droga (Figura R24A). Por tanto, la exposición a MMS durante la fase S no tiene una influencia significativa en los niveles de Rad5 (la cantidad de proteína en ambas situaciones se encuentra cuantificada en la Figura R24C).

Por tanto, es posible concluir que la regulación de la expresión de Rad5 es independiente del daño exógeno en el DNA, y que la cantidad de esta proteína presente en un ciclo celular normal es suficiente para que las células hagan frente a las lesiones en el DNA que se puedan originar durante la replicación cromosómica.

4.3. Rad5 forma focos nucleares en respuesta al daño en el DNA

A continuación analizamos Rad5 *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia, usando una versión de esta proteína etiquetada con *GFP*. Se sincronizaron células *GFP-RAD5* en G1 y se liberaron posteriormente en la fase S en presencia o ausencia de MMS, tras lo cual fueron analizadas al microscopio.

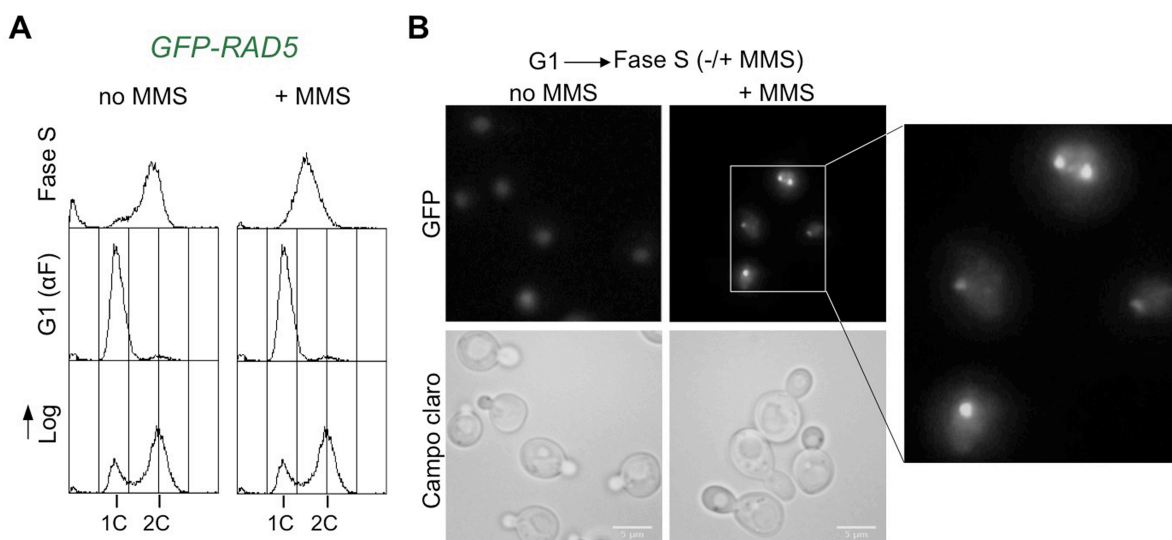


Figure R25. Rad5 forma focos en respuesta a la presencia de daño en el DNA. Se sincronizaron células *GFP-RAD5* (cepa YMO36) en la fase G1 y se liberaron posteriormente en la fase S durante 60 min en medio -/+ MMS (0,033%). **(A)** La progresión en el ciclo celular fue seguida mediante citometría de flujo **(B)** Análisis de la distribución de la proteína Rad5 por microscopía de fluorescencia. El 82,73% de las células tratadas con MMS muestra focos de GFP-Rad5, mientras que dichos focos solo se observan en un 2,90% de las células no tratadas con el agente genotóxico.

La situación en el ciclo celular se comprobó por citometría de flujo (Figura R25A). Rad5 es una proteína nuclear y aparece dispersa en el núcleo en células no tratadas con el agente genotóxico (Figura R25B). Sin embargo, encontramos que Rad5 se acumula formando focos nucleares cuando se expone a las células a MMS durante la fase S. Estos focos se apreciaron en alrededor del 80% de las células y aparecían habitualmente como uno o dos puntos discretos por célula (Figura R25B). Es decir, Rad5 claramente se relocaliza dentro del núcleo en respuesta al daño en el DNA, a pesar del hecho de que no presenta cambios significativos en sus niveles tras el tratamiento con MMS (Figura R24). Además, la formación de focos de Rad5 se observó en la fase S, pero no se detectó acumulación de esta proteína en células bloqueadas en G2/M y tratadas con MMS (Figura R26), lo que apoya una función de Rad5 durante la fase S.

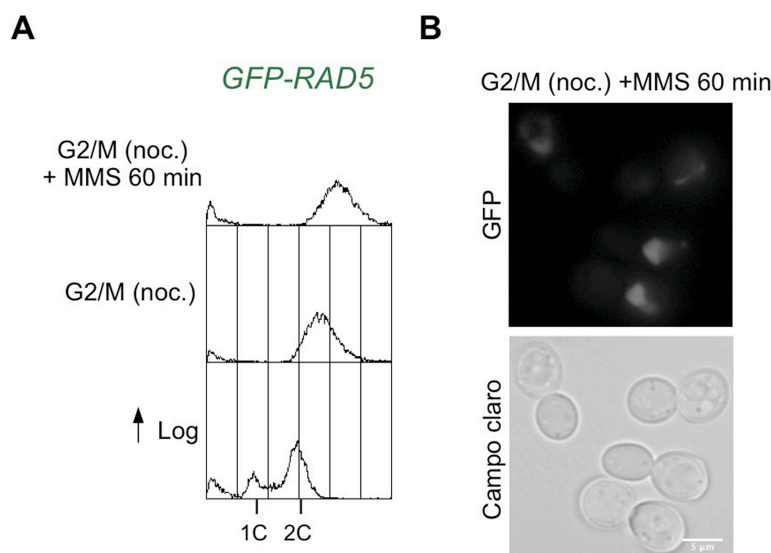


Figura R26. El tratamiento con MMS durante G2/M no da lugar a la formación de focos de Rad5. Se sincronizaron células *GFP-RAD5* (cepa YMO36) en G2/M con nocodazol (3 h) y se mantuvieron durante 60 min adicionales en medio suplementado con esta droga y MMS (0,033%). **(A)** El estado de las células en el ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. **(B)** La proteína Rad5 fue analizada mediante microscopía de fluorescencia. Se estimó un 2,5 % de células con focos de GFP-Rad5.

4.4. La formación de focos nucleares de Rad5 es independiente de sus actividades catalíticas

Ya que tanto la actividad ubiquitina-ligasa como la ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la respuesta celular al MMS, nos preguntamos si dichas actividades tienen algún papel en la relocalización de la proteína observada tras el tratamiento con esta droga. Para abordar esta cuestión, construimos estirpes en las que fusionamos el epítipo GFP a cada una de las versiones mutantes de Rad5. A continuación analizamos células *GFP-RAD5⁺*, *GFP-rad5-I916A*, *GFP-rad5-GAA* y *GFP-rad5-I916A/GAA* *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia. En todos los casos, se sincronizaron las células G1 y se liberaron en la fase S en presencia de MMS, tras lo cual fueron analizadas al microscopio.

La situación en el ciclo celular se comprobó por citometría de flujo (Figura R27A). Las fotografías de la Figura R27A muestran que tanto Rad5 como las tres versiones mutantes de la proteína analizadas -Rad5-I916A, Rad5-GAA y Rad5-I916A/GAA- se relocalizan dentro del núcleo y forman focos en respuesta al tratamiento con MMS. Estos resultados indican que ni la actividad ubiquitina-ligasa ni la actividad ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la formación de los focos de dicha proteína bajo condiciones de daño en el DNA, y por tanto que la relocalización de la proteína observada es independiente de su actividad catalítica.

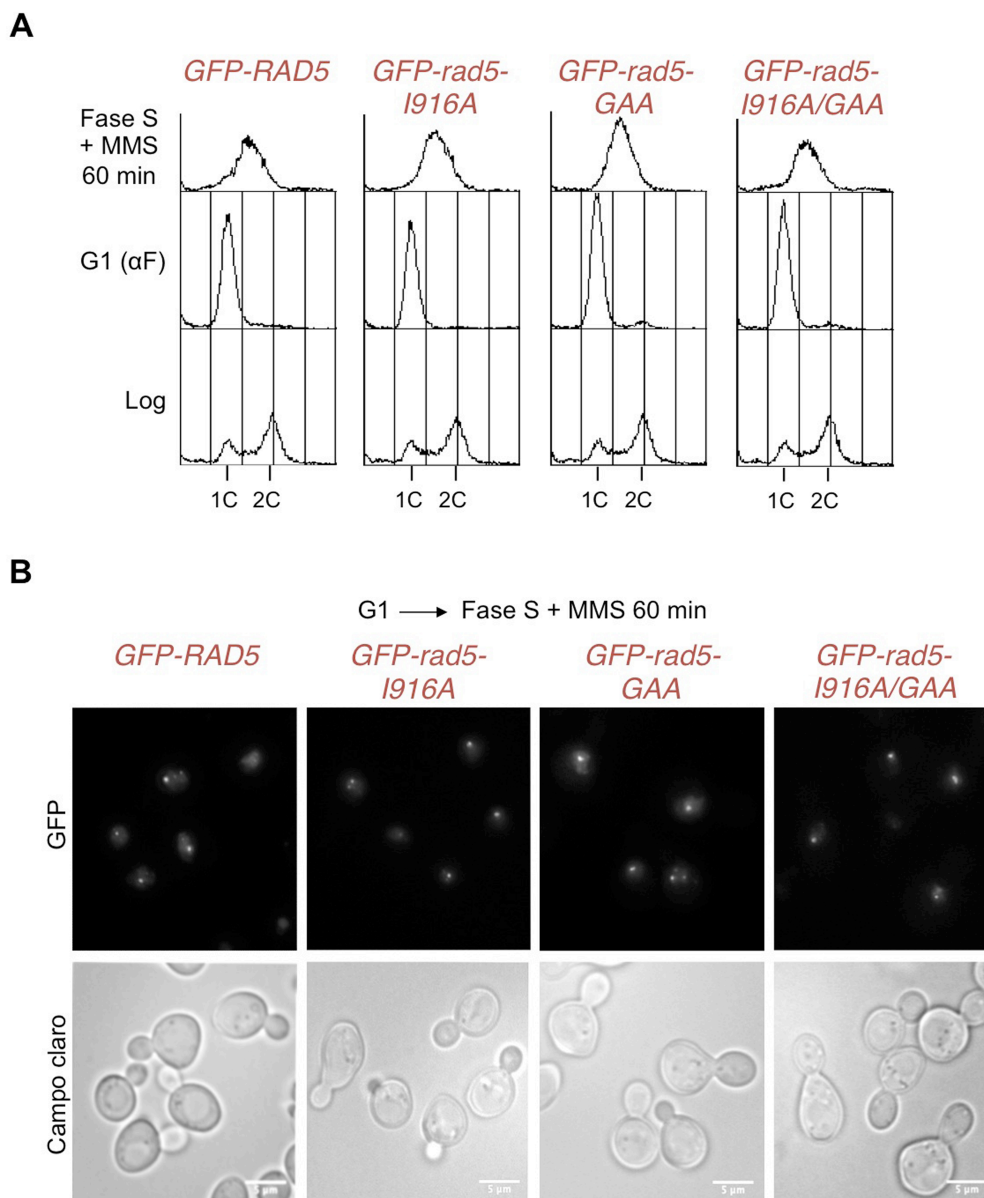


Figura R27. Las actividades ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 no son necesarias para la formación de focos de Rad5 en respuesta a la presencia de daño en el DNA. Se sincronizaron células *GFP-RAD5* (cepa YMO95), *rad5-I916A* (cepa YMO96), *rad5-GAA* (cepa YMO97) y *rad5-I916A/GAA* (cepa YMO98) en la fase G1 y se liberaron posteriormente en la fase S durante 60 min en medio +/- MMS (0,033%). **(A)** La progresión en el ciclo celular fue seguida mediante citometría de flujo **(B)** Análisis de la distribución de la proteína Rad5 o sus versiones mutantes por microscopía de fluorescencia. Se estimó un porcentaje de células con focos de GFP-Rad5 del 79,6%, de GFP-Rad5-I916A del 81,55%, de GFP-Rad5-GAA del 77,8% y de GFP-Rad5-I916A/GAA del 78%.

4.5. Los focos de Rad5 se forman en respuesta a varios tipos de daño en el DNA, pero no como consecuencia del estrés replicativo

Para analizar si la relocalización de Rad5 es una respuesta específica al tratamiento con MMS, o si por el contrario se trata de una respuesta más general al daño en el DNA, estudiamos la formación de focos en células tratadas con otros agentes

genotóxicos como el H_2O_2 o la luz UV. Para ello, bloqueamos células *GFP-RAD5* en G1, las liberamos, y tras 30 min en la fase S las tratamos con H_2O_2 (1 mM) durante 30 min. Por otra parte, bloqueamos células *GFP-RAD5* en G1 y las irradiamos con luz UV (200 J/m^2), tras lo cual las liberamos en la fase S en la oscuridad y tomamos muestras a los 30 min para su análisis. En ambos casos se siguió el estado del ciclo celular por citometría de flujo (Figura R28A) y se observaron las células por microscopía de fluorescencia.

En la mayoría de las células tratadas con el agente oxidante H_2O_2 se observó una relocalización nuclear de Rad5 (Figura R28B). Por tanto, la formación de focos de Rad5 se origina también en respuesta al daño oxidativo. Es interesante que los focos de Rad5-GFP obtenidos tras el tratamiento con H_2O_2 sean en general más numerosos por célula que en el caso de la exposición MMS, lo que sugiere que las diversas lesiones en el DNA originan una relocalización diferente de la proteína Rad5. Con respecto al tratamiento con luz UV, no se observó la formación de focos de Rad5 en las células expuestas a este tipo de irradiación (Figura R28B), lo cual se debe probablemente a que la tolerancia al tratamiento agudo con luz UV se lleva a cabo predominantemente por TLS (Daigaku *et al*, 2010).

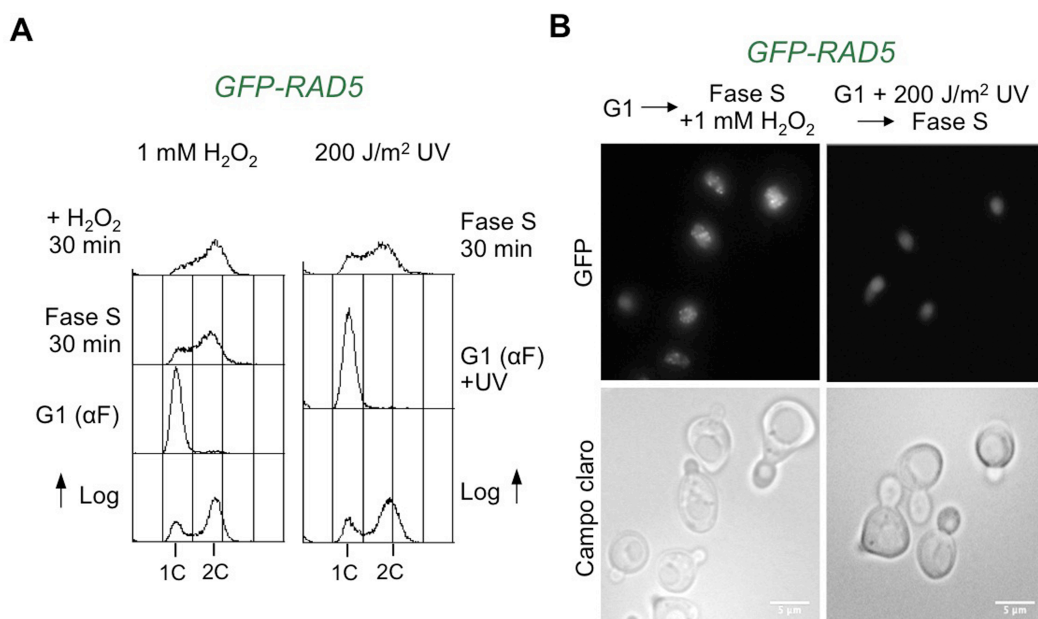


Figura R28. Rad5 forma focos en respuesta al tratamiento con H_2O_2 pero no tras la irradiación con luz UV. Se sincronizaron células *GFP-RAD5* (cepa YMO36) en la fase G1 y se liberaron en la fase S durante 30 min, tras lo cual se trataron con H_2O_2 (1 mM) durante 30 min. Por otra parte se irradiaron con luz UV (200 J/m^2) células *GFP-RAD5* (cepa YMO36) sincronizadas en la fase G1 y se liberaron en la fase S en la oscuridad, analizándose al microscopio a los 30 min. (A) La progresión en el ciclo celular fue seguida mediante citometría de flujo (B) Análisis de la distribución de la proteína Rad5 por microscopía de fluorescencia. Se estimó que forman focos de GFP-Rad5 un 85,73% de las células tratadas con H_2O_2 y un 2,97% de las tratadas con UV.

El MMS provoca lesiones que bloquean la progresión de las horquillas de replicación (Groth *et al*, 2010; Vazquez *et al*, 2008), por lo que nos preguntamos si la formación de focos de Rad5 era una respuesta general a la parada de las horquillas de replicación o si se debía a la presencia de lesiones en el DNA durante la replicación que pudiesen interferir con las horquillas. Para analizar esta cuestión, estudiamos la posible acumulación de Rad5 en células tratadas con hidroximiurea (HU) durante la fase S. Esta droga disminuye los niveles de dNTPs y, al igual que el MMS, provoca el bloqueo de las horquillas de replicación, pero, a diferencia del MMS, no necesariamente daño en el DNA. Como se muestra en la Figura R27, cuando las células se liberaron del bloqueo de G1 en medio con HU, Rad5 mostró una localización nuclear difusa, y no se detectaron células con focos de Rad5. Por tanto, los focos de Rad5 se forman durante la fase S en respuesta a la presencia de lesiones que bloquean la replicación del DNA, pero no simplemente como consecuencia de la parada de las horquillas.

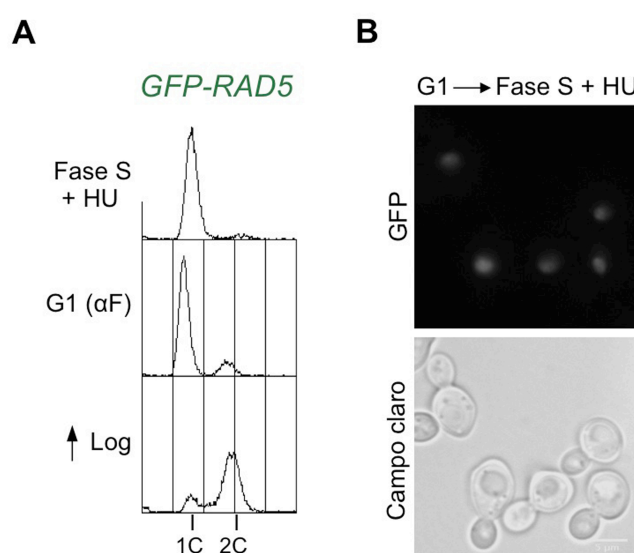


Figura R29. El estrés replicativo causado por hidroximiurea no da lugar a la formación de focos de Rad5.

Células sincronizadas en G1 se liberaron en fase S durante 120 min en medio con HU 0,2 M. (A) El estado de las células en el ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo (B) La proteína Rad5 fue analizada mediante microscopía de fluorescencia. Se estimó que forman focos de GFP-Rad5 un 2,19% de las células tratadas con HU.

Un estudio reciente a gran escala ha identificado Rad5 como una de las proteínas que muestran cambios en su localización en respuesta al estrés replicativo inducido por diferentes drogas (Tkach *et al*, 2012). Aunque nuestros resultados están de acuerdo y extienden los datos obtenidos en este estudio acerca de la relocalización nuclear de Rad5 tras el tratamiento con MMS en células asincrónicas, difieren de los datos que

proponen una acumulación de Rad5 en respuesta al tratamiento con HU. De este modo, nuestros estudios muestran que no todos los tipos de estrés inducidos durante la replicación del DNA causan la formación de focos de Rad5, sino que solo los bloqueos de la replicación originados por algunos agentes que causan daño en el DNA provocan la relocalización de esta proteína.

4.6. La relocalización nuclear de Rad5 es independiente de Rad18 y del *checkpoint* de la fase S

En respuesta al daño en el DNA, PCNA es monoubiquitilado por Rad6-Rad18, y a continuación puede ser poliubiquitilado en *S. cerevisiae* por Rad5-Ubc13-Mms2 (Hoegge *et al*, 2002). Se sabe, además, que Rad5 interacciona con el complejo Rad6-Rad18 (Ulrich y Jentsch, 2000). Teniendo esto en cuenta, analizamos la posibilidad de que la relocalización de Rad5 dependiese de Rad18, y encontramos que no había diferencias en la formación de focos de Rad5 en células *rad18Δ* tratadas con MMS en fase S en comparación con células *RAD18⁺*. Así, tras bloquear las células en G1 y liberarlas en medio con MMS, la mayoría de las células *rad18Δ* mostraron una clara acumulación de Rad5, que formaba focos discretos (Figura R30). Por lo tanto, ni la monoubiquitilación de PCNA ni la presencia de Rad18 son necesarias para la formación de focos de Rad5 inducidos por daño en el DNA.

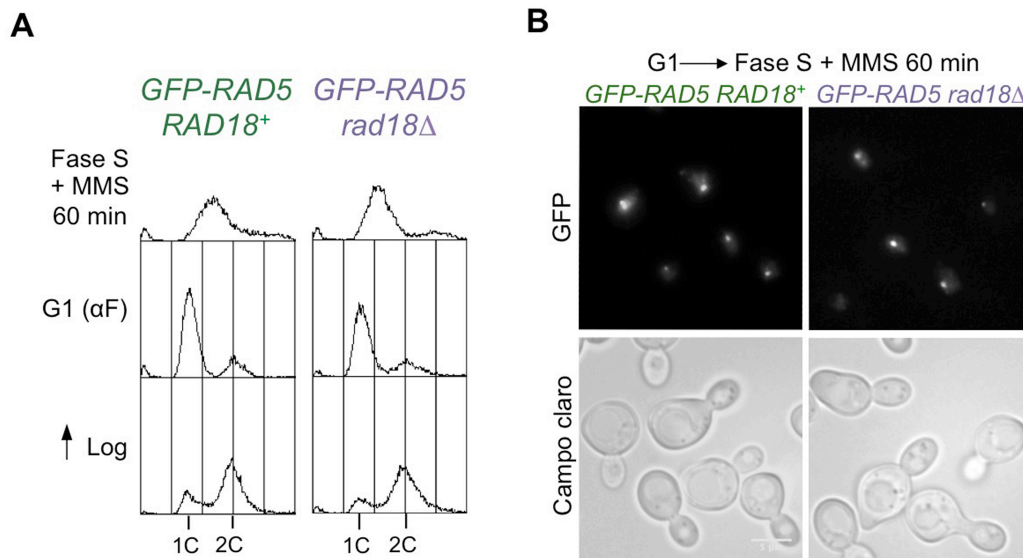


Figura R30. La proteína Rad18 no es necesaria para la formación de los focos de Rad5 que se originan tras el tratamiento con MMS. Se sincronizaron células *GFP-RAD5* (cepa YMO36) y *GFP-RAD5 rad18Δ* (cepa YMO51) en la fase G1 con factor α y se liberaron durante 60 min en medio fresco suplementado con MMS 0,033%. (A) El estado de las células en el ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. (B) La proteína Rad5 fue analizada mediante microscopía de fluorescencia. Se estimó que forman focos de GFP-Rad5 un 76,32% de las células *rad18Δ*.

Asimismo, la relocalización de Rad5 no requiere la activación del *checkpoint* de la fase S que desencadena el tratamiento con MMS, ya que también se observaron focos de Rad5 en estirpes carentes de las quinasas del *checkpoint* Mec1 y Rad53 (*mec1Δ* y *rad53Δ*) tras el tratamiento con esta droga en la fase S (Figura R31).

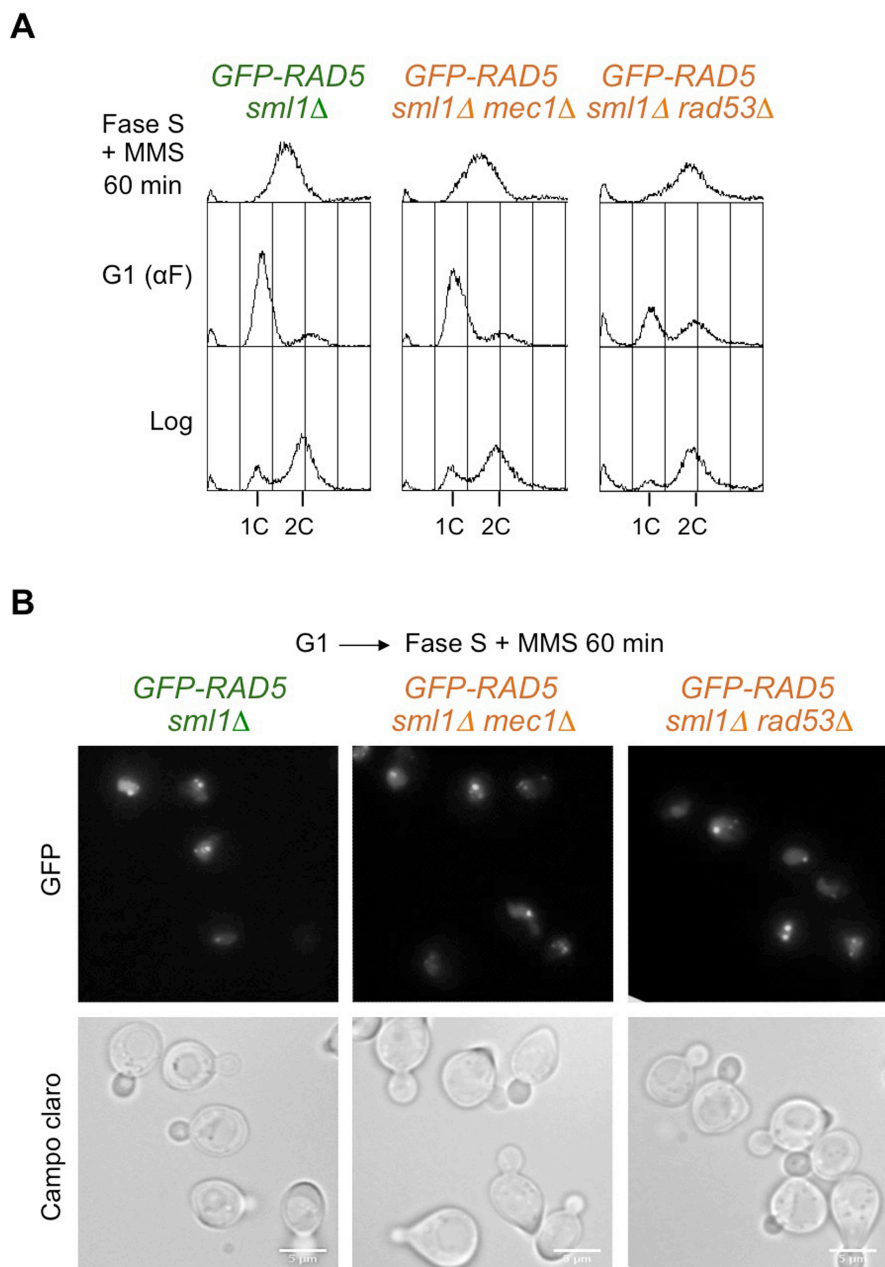


Figura R31. El *checkpoint* de la fase S no es necesario para la formación de los focos de Rad5 que se originan tras el tratamiento con MMS. Se sincronizaron células *GFP-RAD5 sml1Δ mec1Δ* (cepa YMG19), *GFP-RAD5 sml1Δrad53Δ* (cepa YMO45) y control *GFP-RAD5 sml1Δ* (cepa YMO47) en la fase G1 con factor α y se liberaron durante 60 min en medio fresco suplementado con MMS 0,033%. **(A)** El estado de las células en el ciclo celular se siguió mediante citometría de flujo. **(B)** La proteína Rad5 fue analizada mediante microscopía de fluorescencia. Se estimó que forman focos de GFP-Rad5 un 81,87% de las células *sml1Δ*, un 63,74% de las *sml1Δrad53Δ* y un 74% de las *sml1Δmec1Δ*.

5. REVERSIBILIDAD DEL DEFECTO CAUSADO POR LA CARENCIA DE Rad5 DURANTE LA REPLICACIÓN CROMOSÓMICA EN PRESENCIA DE DAÑO EN EL DNA

5.1. Las consecuencias del tratamiento con MMS durante la replicación cromosómica en células carentes de Rad5 son reversibles mediante nueva expresión de esta proteína

Los resultados que se muestran en esta tesis indican que Rad5 lleva a cabo su papel en la tolerancia al daño en el DNA durante la fase S, permitiendo que las células completen la replicación cromosómica en presencia de lesiones en el DNA. Sin embargo, se ha demostrado que si se restringe la expresión de Rad18 hasta que se ha completado la replicación de la mayor parte del genoma, esto es suficiente para que las células tratadas con UV sean viables (Daigaku *et al*, 2010). Del mismo modo, la expresión de Rad5 en G2/M permite la supervivencia tras un tratamiento agudo de las células con MMS (Karras y Jentsch, 2010). Las condiciones experimentales empleadas por estos autores son diferentes a las que se han usado a lo largo de esta tesis, ya que nosotros tratamos las células con MMS específicamente durante la replicación del DNA en lugar de en G1, y utilizamos una temperatura diferente (30°C en lugar de 23°C), que influye en el número de lesiones que origina la droga. Por ello, decidimos investigar, usando las condiciones empleadas a lo largo de esta tesis, si la nueva expresión de Rad5 a distintos tiempos durante y después de la fase S podía rescatar la pérdida de viabilidad que sufrían las células carentes de esta proteína y tratadas con MMS durante la fase S. Esto nos permitiría averiguar, en primer lugar, si las consecuencias de la carencia de Rad5 en células expuestas a daño en el DNA durante la fase S son reversibles y, a su vez, si la función de esta proteína se puede desacoplar de la replicación del DNA.

Construimos una estirpe en la que se etiquetó Rad5 con GFP y se expresó como proteína de fusión bajo el promotor *GALS* para permitir su expresión condicional. Para caracterizar esta estirpe, analizamos la sensibilidad de las células *P_{GALS}-RAD5-GFP* al tratamiento con MMS en medio suplementado con glucosa o galactosa. La figura R32A muestra que estas células crecieron de forma normal en medio sin droga y que se comportaron como un mutante *rad5Δ* en medio con MMS y glucosa (promotor *GALS* inactivo). Por el contrario, en medio con galactosa (promotor *GALS* activado), las células *P_{GALS}-RAD5-GFP* mostraron una resistencia al MMS similar a la del control del tipo silvestre. Por lo tanto esta estirpe es un sistema adecuado para la expresión condicional de Rad5.

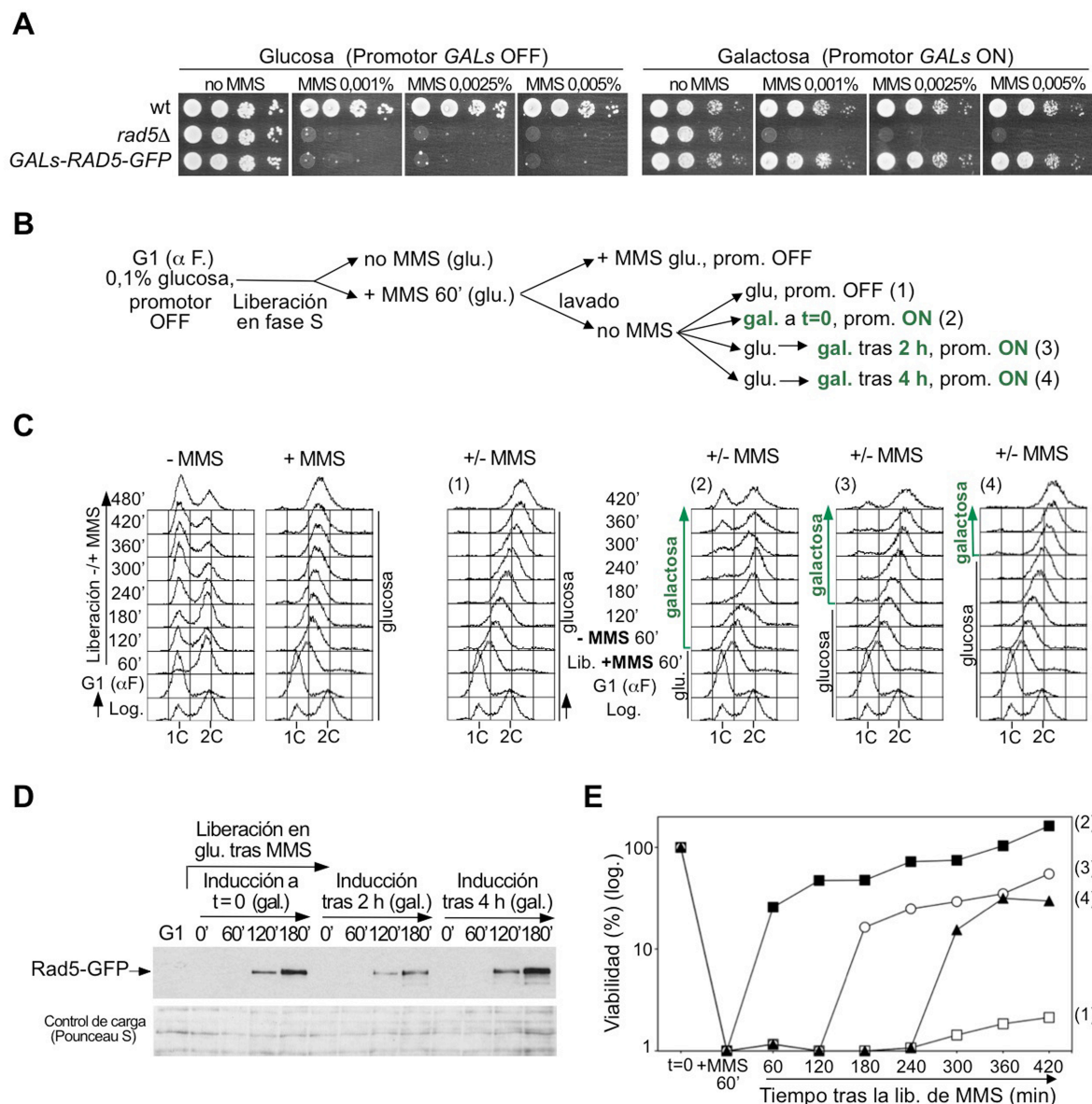


Figura R32. Los efectos del tratamiento con MMS durante la fase S en células carentes de Rad5 son reversibles mediante la nueva expresión de esta proteína. (A) Sensibilidad al MMS de las células *RAD5*⁺ (cepa SY2080), *rad5Δ* (cepa SY2214) y *P_{GALS}-RAD5-GFP* (cepa YMO77). Se plaquearon diluciones seriadas (decimales) de cultivos logarítmicos normalizados en placas de YP-Glucosa o YP-Galactosa suplementadas con la cantidad indicada de MMS y se incubaron durante 72 h a 30°C. **(B)** Esquema del experimento. Los números de la derecha se corresponden con los de los paneles de citometría de flujo y los del gráfico de la viabilidad. **(C)** Progresión en el ciclo celular analizada por citometría de flujo. **(D)** Análisis de la expresión de Rad5 por inmunoblot. **(E)** Viabilidad celular a lo largo del experimento, estimada mediante el recuento de unidades formadoras de colonias.

Las células *P_{GALS}-RAD5-GFP* se crecieron en medio con 0,1% de glucosa, (promotor *GALS* inactivo), se sincronizaron en G1 con factor α y se liberaron en medio fresco suplementado con 0,1% de glucosa, sin o con MMS. Tras 60 min, el cultivo con MMS, en el que las células se encontraban en fase S, se dividió en tres partes: una parte

se mantuvo en medio con glucosa y con MMS; en las otras dos, se eliminó el MMS y las células se pasaron a medio con glucosa o con galactosa. La inducción con galactosa se llevó a cabo además 2 y 4 h después de eliminar el MMS. Se puede ver un esquema del experimento en la Figura R32B. La progresión en el ciclo celular se monitorizó por citometría de flujo (Figura R32C) y la expresión de Rad5 se analizó por inmunoblot (Figura R32D). La viabilidad celular se estimó a lo largo del experimento a los tiempos indicados (Figura R32E).

Las células carentes de Rad5 progresaron normalmente durante varios ciclos tras ser liberadas del bloqueo en G1 en medio sin MMS (Figura R32C, panel 1). Por el contrario, estas células no pudieron completar la replicación en presencia de MMS (Figura R32C, panel 2), y perdieron viabilidad hasta aproximadamente un 1% al cabo de 60 min (Figura R32E). Por lo tanto, las células *P_{GALS}-RAD5-GFP* tratadas con MMS en medio con glucosa se comportaron como el mutante *rad5Δ* (Figura R3). Tras eliminar el MMS en ausencia de Rad5, las células progresaron a través de la fase S alcanzando un contenido de DNA de 2C (Figura R32C, panel 3), pero no recuperaron la viabilidad (Figura R32E) e incluso 7 h después de la eliminación del MMS no completaron el ciclo celular. Sin embargo, cuando las células *P_{GALS}-RAD5-GFP* se transfirieron a medio con galactosa sin MMS (Figura R32C, panel 4), la inducción de Rad5 fue detectable a las 2 h (Figura R32D), y las células completaron el ciclo celular (Figura R32C, panel 4). Además, la viabilidad celular se recuperó rápida y significativamente (Figura R32E). Por consiguiente, las células que aún se encontraban en la fase S antes de ser plaqueadas, como indica la citometría de flujo (60 y 120 min tras la eliminación del MMS; Figura R32C, panel 4), recuperaron un alto grado de viabilidad al sintetizar Rad5 *de novo* (Figura R32E), lo que indica que los efectos del daño en el DNA en ausencia de Rad5 pueden ser revertidos. Cuando la expresión de Rad5 se indujo más tarde, 2 o 4 h tras la eliminación del MMS (Figura R32C, panel 5-6), los resultados obtenidos fueron muy similares, de modo que la viabilidad también se recuperó rápidamente en ambos casos (Figura R32E). De hecho, cuando la inducción con galactosa se llevó a cabo 4 h tras la eliminación del MMS, las células ya habían alcanzado el pico de 2C de contenido de DNA (Figura R32C, panel 6), lo que indica que Rad5 también puede funcionar después de que se haya producido la replicación de la mayor parte del genoma.

En conjunto, nuestros resultados muestran que las consecuencias de la carencia de Rad5 durante la replicación cromosómica en presencia de daño en el DNA causado por MMS, son en gran parte reversibles por la nueva expresión de esta proteína. Asimismo, estos resultados indican que Rad5 opera durante la fase S para responder al daño en el DNA surgido durante la replicación cromosómica, pero que también puede hacerlo cuando las células han acabado la mayor parte de la replicación del genoma, lo

que estaría de acuerdo con lo publicado en trabajos anteriores (Daigaku *et al*, 2010; Karras y Jentsch, 2010). Por lo tanto, nuestros resultados muestran un papel principal de la rama dependiente de Rad5 de la ruta de tolerancia al daño durante la fase S, pero indican que Rad5 puede funcionar también desacoplada de la replicación del DNA, lo que apoyaría también la posibilidad de un modo de acción post-replicativo de esta proteína.

DISCUSIÓN

Los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA tienen un papel esencial en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Las lesiones en el material genético que permanecen sin reparar en el momento de la replicación cromosómica suponen una grave amenaza para las células, ya que ponen en riesgo la necesaria duplicación del genoma en cada ciclo celular. La ruta *RAD6/RAD18*, conservada evolutivamente en las células eucarióticas, permite el baipás de estas lesiones mediante diferentes mecanismos, haciendo posible que la replicación cromosómica se complete cuando existen lesiones en el DNA. En esta tesis hemos intentado aportar datos que ayuden a comprender mejor la función y regulación de estos mecanismos de tolerancia al daño en el material genético. Utilizando *S. cerevisiae* como modelo eucariótico y el compuesto alquilante MMS como agente modelo causante de lesiones en el DNA, hemos analizado en primer lugar la contribución de los componentes de la ruta *RAD6/RAD18* a la replicación cromosómica bajo condiciones de daño en el DNA. A continuación, hemos profundizado en el análisis de la parte de esta ruta con más relevancia en la respuesta celular analizada, mediada por Rad5, analizando su función, las actividades requeridas y diversos aspectos de su regulación.

1. Las polimerasas de síntesis a través de lesiones tienen un papel minoritario en la tolerancia al daño en el DNA originado por el MMS durante la replicación cromosómica

Al analizar la contribución de cada una de las ramas de la ruta *RAD6/RAD18* a la tolerancia al daño en el DNA causado por el MMS en una única fase S, encontramos que la aportación de las polimerasas de síntesis a través de lesiones a este proceso es muy limitada. Además, observamos que la función de cada una de ellas puede ser sustituida por otra polimerasa de TLS, lo que disminuye aún más el requerimiento específico de cada una de estas proteínas para la tolerancia al daño en el DNA inducido en nuestros experimentos. De hecho, el efecto que las polimerasas de TLS ejercen en la respuesta celular al tratamiento con MMS solo es evidente cuando las células carecen de todas ellas. No obstante, este efecto, aunque significativo, es muy moderado en comparación con la falta de la otra rama de la ruta *RAD6/RAD18*, mediada por Rad5. Esta función minoritaria de las TLS en la tolerancia al daño originado por el MMS reduce sin duda la posibilidad de mutagénesis. Sin embargo, aunque podría pensarse que, dado que pueden originar errores durante la replicación cromosómica, el papel de las polimerasas de TLS en la tolerancia a las lesiones en el DNA sería siempre minoritario, ejercen por el contrario una función principal en la respuesta ante determinados tipos de daño en el material genético. Por ejemplo, cuando las células de levaduras se someten a una exposición aguda a luz UV, otro agente causante de daño en el DNA que se emplea

habitualmente, la síntesis de DNA a través de lesiones es el principal mecanismo responsable de tolerar el daño que se origina en el DNA (Daigaku *et al*, 2010). No obstante, en este caso concreto, el empleo de las polimerasas de TLS tiene un menor riesgo de mutagénesis, ya que las lesiones que se generan con mayor frecuencia como resultado de la irradiación UV son dímeros de timina, que pueden ser copiados por Pol η , la cual incorpora dos adeninas frente a la lesión, de modo que, con frecuencia, la región dañada se replica correctamente. Asimismo, en células humanas, las lesiones causadas por agentes ambientales como el humo del tabaco o la luz UV se toleran predominantemente por síntesis de DNA a través de lesiones (Izhar *et al*, 2013). Por tanto, es necesario analizar en cada caso la contribución específica de cada una de las ramas de la ruta de tolerancia al daño en el DNA para valorar cuál es la predominante.

2. Posible significado evolutivo de la existencia de las polimerasas de TLS

Todos los organismos -arqueas, procariotas y eucariotas- cuyos genomas se han secuenciado poseen polimerasas de TLS, responsables en gran parte de la mutagénesis que se produce en las células. Una cuestión que podríamos plantearnos es por qué se han conservado las polimerasas de síntesis a través de lesiones a lo largo de la evolución, cuando existen otros mecanismos libres de errores que permiten en principio tolerar el daño que se origina en el DNA. Parece evidente que, a pesar del potencial peligro que suponen, las polimerasas de *baipás* deben ser en conjunto un beneficio para las células, ya que de otra forma no se habrían fijado evolutivamente.

Por una parte, a pesar de su carácter mutagénico, las polimerasas de TLS juegan un papel importante en la protección de las células frente a determinados tipos de daño en el DNA, lo que indica que actúan normalmente. Así, estas polimerasas son responsables de parte de la tolerancia a determinadas lesiones que bloquean las horquillas de replicación, que en el caso de no ser toleradas podrían dar lugar a muerte celular o derivar en inestabilidad genómica. Esta contribución, que en el caso concreto del estudio llevado a cabo en esta tesis es muy limitada, es diferente según las distintas condiciones de daño en el DNA, pudiendo incluso llegar a ser TLS la vía preponderante, como se ha citado anteriormente. Esta importancia se pone de manifiesto por ejemplo en los pacientes de XPV (variante de xerodermia pigmentosa), en los que la carencia de Pol η da lugar a una alta incidencia de cáncer de piel (Johnson *et al*, 1999a; Masutani *et al*, 1999).

Por otra parte, la mutagénesis es un proceso imprescindible en la evolución de las especies (Abdulovic *et al*, 2006). En organismos unicelulares, como las bacterias, las polimerasas de TLS introducen mutaciones al replicar un DNA dañado (Foster, 2007; Galhardo *et al*, 2007), lo cual puede resultar en un aumento de la variabilidad genética de

las poblaciones, que en determinadas circunstancias podría dar lugar a cambios que permitan una mejor adaptación al ambiente.

Además, en eucariotas superiores, las polimerasas de TLS desempeñan otro papel importante, participando en la hipermutación somática mediante la introducción de mutaciones en las cadenas variables de los anticuerpos en los linfocitos B, lo que permite diversificar los anticuerpos que se pueden producir (Casali *et al*, 2006). Las polimerasas de TLS no solo se han conservado en la evolución, sino que han aumentado su número desde las dos existentes en procariotas o tres en *S. cerevisiae* hasta al menos ocho en humanos (Lange *et al*, 2011; Sale, 2013; Waters *et al*, 2009). Esta diversificación de las polimerasas de TLS proporcionaría una mayor versatilidad en la respuesta al daño en el DNA, permitiendo un baipás más eficiente de las lesiones no reparadas así como una cierta especialización de cada polimerasa en la tolerancia de determinadas lesiones (Friedberg *et al*, 2002; Waters *et al*, 2009).

Teniendo todo en cuenta, es posible afirmar que el peligro que entraña el empleo de polimerasas mutagénicas es superado por el beneficio que conlleva disponer de este mecanismo -con su compleja regulación, que limita su actuación a determinadas situaciones-, como refleja el hecho de que se haya fijado a lo largo de la evolución (Lange *et al*, 2011; Sale, 2013; Waters *et al*, 2009).

3. La rama libre de errores dependiente de Rad5 de la ruta *RAD6/RAD18* es la principal responsable de la tolerancia al daño en el DNA originado por el MMS durante la replicación cromosómica

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que la rama libre de errores de la ruta *RAD6/RAD18*, mediada por Rad5, ejerce la función principal en la tolerancia al daño en el DNA inducido por el MMS durante la fase S. Esta función predominante dependiente de Rad5 garantiza una respuesta celular que permite tolerar las lesiones no reparadas en el DNA mediante un proceso libre de errores, minimizando el riesgo de mutagénesis.

El tratamiento de las células con diferentes concentraciones de MMS durante una única fase S que llevamos a cabo mostró que Rad5 es estrictamente necesaria para hacer frente al daño en el DNA durante la replicación cromosómica, y que su función permite completar la misma y mantener la viabilidad celular. Es destacable el hecho de que, incluso una dosis muy baja de MMS, que resulta inocua para las células silvestres o las mutantes *t/sΔ*, cause graves defectos en las células que carecen de Rad5, impidiendo la progresión en el ciclo celular e induciendo la activación del *checkpoint* de la fase S. Es interesante que una dosis tan baja, que en principio causaría muy pocas lesiones en el DNA, origine estos problemas en ausencia de Rad5, ya que cabría esperar que otras

rutas, sin necesidad de DDT, pudiesen repararlas. Estos resultados sugieren, sin embargo, que existe un requerimiento específico de Rad5 para hacer frente a este tipo de lesiones en el DNA durante la fase S, que no puede ser sustituido por ninguna otra ruta de reparación o tolerancia al daño en el DNA.

4. Las actividades ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la tolerancia al daño en el DNA

En esta tesis hemos mostrado también que las actividades ubiquitina-ligasa (E3) y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias y resultan igualmente importantes para la función de esta proteína durante la respuesta al daño en el DNA inducido por MMS durante la fase S. El hecho de que los mutantes que carecen de una u otra actividad muestren una similar reducción de la viabilidad celular tras ser expuestos a MMS durante una fase S, y que el doble mutante carente de las dos actividades no sea más sensible a esta droga que los mutantes individuales, sugiere que las actividades ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa podrían actuar secuencialmente, al menos en la tolerancia a las lesiones en el DNA causadas por MMS. Se sabe que la función ATPasa de Rad5 no es necesaria para la modificación de PCNA en respuesta al tratamiento con MMS (Chen *et al*, 2005), pero si las actividades helicasa y ubiquitina-ligasa fuesen independientes,

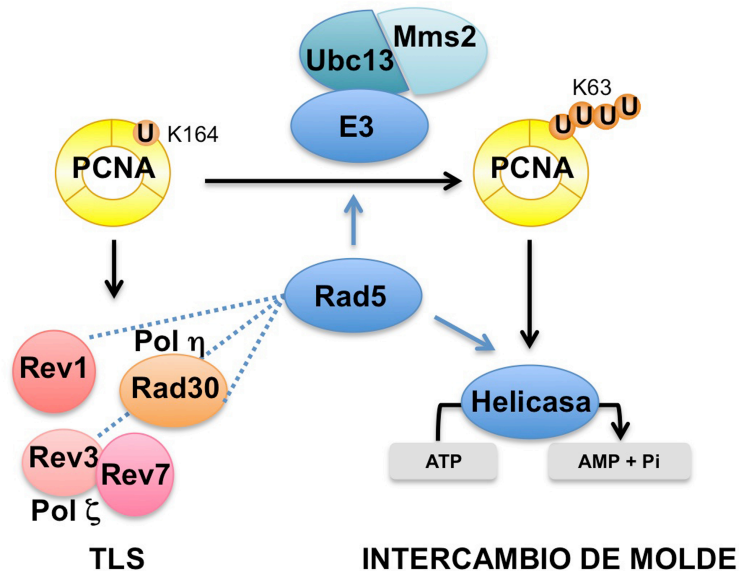


Figura D1. Acciones de Rad5 en la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño. En primer lugar, la acción de Rad5 como E3 ligasa junto con el complejo conjugador Ubc13-Mms2 da lugar a la poliubiquitilación de PCNA, lo que a su vez permite la actuación de Rad5 como helicasa y la tolerancia al daño libre de error debida al intercambio de cadenas molde. Por otra parte Rad5 modula la acción de las polimerasas de síntesis a través de lesiones.

observaría una mayor sensibilidad al MMS de los mutantes *rad5-1916A/GAA* o *ubc13Δ/rad5-GAA* respecto a los mutantes individuales, lo cual no ocurre. En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad helicasa de Rad5 ocurriría después de la poliubiquitilación de PCNA.

Estos datos apoyan el modelo en el que el intercambio de cadenas molde mediado por la actividad helicasa de Rad5 sería facilitado por la poliubiquitilación de PCNA (Figura D1). Como se ha propuesto anteriormente (Chang y Cimprich, 2009), esto podría llevarse a cabo bien porque esta modificación provoque el desplazamiento de proteínas que se asocian a PCNA, como las polimerasas de TLS, dejando espacio para la actuación de la rama dependiente de Rad5, o bien porque PCNA poliubiquitilado actúe como plataforma para el reclutamiento de otras proteínas que participen junto con Rad5 en el mecanismo de intercambio de molde.

Si bien este es el modelo de acción para Rad5 que creemos más probable basándonos en nuestros datos y en los de otros trabajos, un estudio reciente (Ball *et al*, 2014) afirma que el dominio helicasa de Rad5 juega un papel estructural necesario para la interacción con Ubc13 y la poliubiquitilación de PCNA. Asimismo, en este trabajo se propone que el requerimiento del dominio helicasa -e incluso del ubiquitina-ligasa- se puede obviar empleando una proteína de fusión entre Rad5 y Ubc13, de modo que la actividad helicasa no sería necesaria para la tolerancia al daño en el DNA. Estos datos están en contradicción con el trabajo de Chen *et al* (2005), en el que como se ha dicho anteriormente se muestra que la actividad helicasa no es necesaria para la poliubiquitilación de PCNA. La diferencia entre ambos trabajos, que quizá se deba a los distintos mutantes utilizados, no invalidaría nuestros resultados, ya que en la respuesta de las células al tratamiento con MMS son necesarias ambas actividades de Rad5. En el caso de que los resultados del trabajo de Ball *et al* (2014) sean correctos, nos impedirían plantear el modelo secuencial de actuación de Rad5 descrito al principio de este apartado, dejando abierta la posibilidad de que la función de la actividad helicasa sea realmente mediar la interacción con el complejo conjugador de ubiquitina Ubc13-Mms2.

5. Rad5 es necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado

Nuestros datos indican que la función de Rad5 en la respuesta al daño en el DNA causado por MMS durante la fase S permite completar la replicación cromosómica. El análisis *in vivo* de la progresión de las horquillas de replicación mediante ensayos de sustitución de densidad de isótopos permitió evaluar y cuantificar de forma directa los efectos que tiene la ausencia de Rad5 en la replicación de un DNA dañado. Los resultados obtenidos en esta tesis indican que esta proteína es absolutamente necesaria

para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA con lesiones. De hecho, las células carentes de las actividades ubiquitina-ligasa o ATPasa/helicasa muestran también una progresión defectiva de las horquillas, aunque no tan grave como las células carentes de la proteína completa.

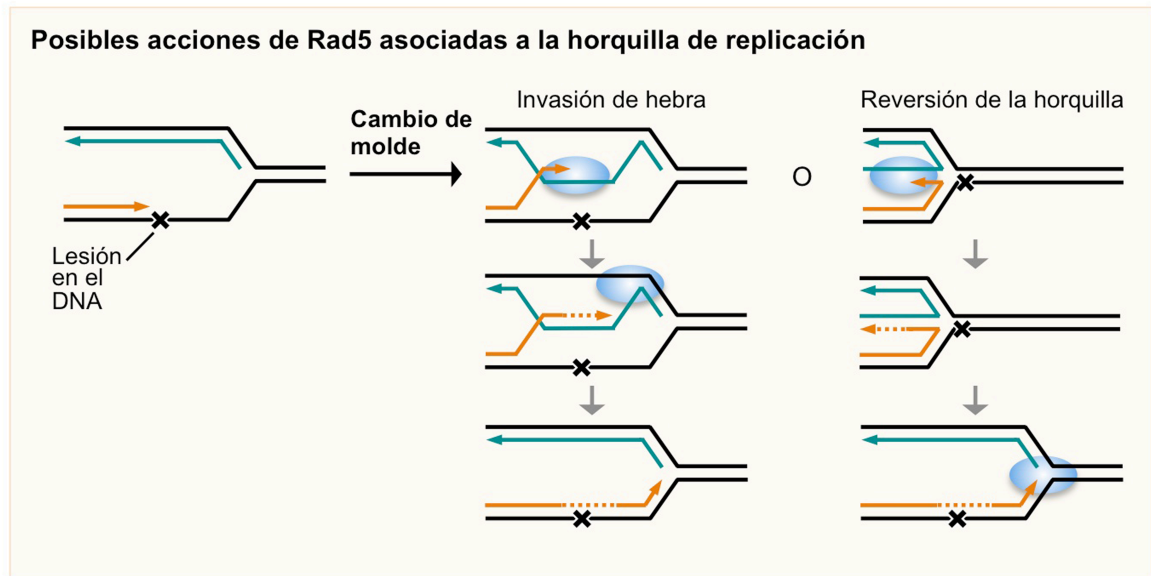


Figura D2. Posibles acciones de Rad5 en el mecanismo de cambio de molde asociado a la horquilla de replicación. Rad5 (en azul), podría participar de distintos modos en el mecanismo de cambio de molde: bien permitiendo la invasión de hebra en la cromátida hermana o incluso facilitando la abertura de las dos cadenas de la cromátida hermana; o bien llevando a cabo una reversión de la horquilla de replicación que permita la asociación de las dos cadenas nacientes y la posterior regresión de esta estructura tras la replicación de la zona de la lesión.

Esto indica una función directa de Rad5 en las horquillas de replicación, acoplada por tanto a la replicación cromosómica, que explica dónde y cuándo actúa la rama libre de errores de la ruta *RAD6/RAD18* de tolerancia al daño en el DNA. De acuerdo con los otros resultados de este trabajo, las células carentes de todas las polimerasas de TLS no mostraron por el contrario diferencias significativas con las células silvestres en la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por alquilación. Si bien los efectos del MMS y de la luz UV son diferentes, este resultado es similar a los de trabajos anteriores que muestran que la ausencia de las polimerasas de TLS tampoco afecta a la progresión de las horquillas de replicación tras la exposición a la luz UV (Callegari *et al*, 2010; Lopes *et al*, 2006).

El requerimiento de Rad5 para el avance de las horquillas de replicación en presencia de daño en el DNA implica que esta proteína tiene una función acoplada a la replicación. Este papel podría llevarse a cabo mediante su participación en dos procesos que no son mutuamente excluyentes (Figura D2): la regresión de las horquillas de

replicación y quizá su posterior reversión, o la invasión de la cromátida hermana por parte de la hebra naciente bloqueada por la lesión. En este último caso, Rad5 podría estar implicada tanto en el desenrollamiento de la hebra naciente bloqueada y su cadena molde dañada, como en el desanillamiento de las cadenas de la cromátida hermana, o incluso en el apareamiento temporal de las dos cadenas hijas, facilitando en todos los casos el intercambio temporal de molde para replicar la zona de DNA dañada.

6. Rad5 está regulado en el ciclo celular

En esta tesis mostramos que Rad5 es una proteína periódica cuyos niveles oscilan a lo largo del ciclo de división mitótico, alcanzando un máximo durante la fase S. Este modo de regulación de la proteína apoya firmemente que la función de Rad5 se lleva a cabo principalmente durante esta fase del ciclo celular, lo que, a su vez, está de acuerdo con el papel que hemos mostrado para esta proteína facilitando la replicación cromosómica en presencia de daño en el DNA.

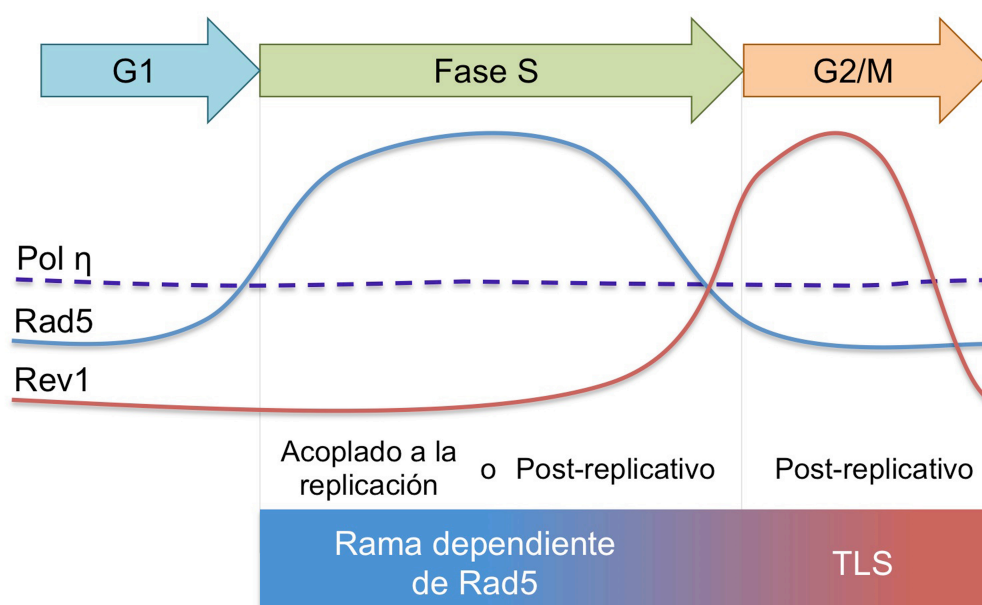


Figura D3. Modelo de utilización de los mecanismos de la ruta *RAD6/RAD18* en el ciclo celular según los niveles de las proteínas implicadas a lo largo del mismo. Durante la fase S hay altos niveles de Rad5, que provocarían la poliubiquitilación de PCNA canalizando la tolerancia al daño hacia la vía libre de error dependiente de Rad5, que podría actuar bien acoplada a la maquinaria replicativa o tras el paso de las horquillas de replicación. Al final de la fase S y durante G2/M los niveles de Rad5 disminuyen, posibilitando la actuación, probablemente post-replicativa, de la rama de síntesis a través de lesiones. La actuación de la rama de TLS estaría a su vez favorecida por el aumento de niveles de la proteína Rev1, que actúa como una plataforma a la que se pueden unir las demás polimerasas de TLS.

La oscilación de Rad5 podría reflejar una regulación transcripcional del gen que la codifica, y también que la degradación de la proteína podría estar controlada a lo largo del ciclo celular. De hecho, el análisis de la secuencia tanto del gen como de la proteína sugiere que las dos opciones son posibles. Por una parte, *RAD5* contiene secuencias MluI (5'-ACGCGT-3'), presentes en los promotores de muchos de los genes necesarios para la síntesis de DNA en *S. cerevisiae* que se expresan de forma coordinada en la transición entre las fases G1 y S. La región promotora de *RAD5* contiene una secuencia MluI en la posición -137 y otra secuencia relacionada (5'-GCGCGT-3'), en la posición -161 (Johnson *et al*, 1992), lo que sugiere que la transcripción de Rad5 podría estar regulada de una forma dependiente del ciclo celular por estas secuencias. Es más, *RAD5* se identifica por como uno de los múltiples genes cuyos transcritos oscilan en el ciclo celular, con un pico de expresión en G1 (Spellman *et al*, 1998). Por otra parte, Rad5 contiene varias “cajas de destrucción” (D-boxes) en su secuencia -dos que cumplen el consenso mínimo, R-X-X-L, y otra con el consenso completo, R-X-X-L-X-X-X-N/D/E-, que podrían ser dianas del complejo promotor de anafase (APC) y dar lugar a la degradación de la proteína por proteasoma (King *et al*, 1996).

La regulación de Rad5 contrasta con la de otros componentes de la ruta *RAD6/RAD18*, como Rev1, cuyos niveles muestran un pico de expresión en G2/M (Sabbioneda *et al*, 2007; Waters y Walker, 2006). Rev1 actúa como plataforma de unión para otras polimerasas de TLS y es imprescindible para la unión de Pol ζ (Acharya *et al*, 2006; Hirano y Sugimoto, 2006; Lawrence, 2002; Masuda *et al*, 2003), y su ausencia durante la fase S podría provocar que, aunque PCNA se encontrase monoubiquitilado, Pol ζ no se uniese a PCNA, y que la unión de Pol η fuera quizás menos eficiente durante la fase S que en G2/M, cuando los niveles incrementados de Rev1 podrían facilitar su unión. Esta regulación sugiere que las polimerasas de TLS actúan tras el grueso de la replicación del genoma. Teniendo todos los datos en cuenta, se puede concluir que la regulación de estas proteínas de la ruta *RAD6/RAD18* permite que las células usen preferentemente la rama libre de error como primera opción durante la fase S, ya sea acoplada a la maquinaria de replicación o tras el paso de esta, de una forma post-replicativa, dejando la posible acción mutagénica de las polimerasas de síntesis translesión restringida a G2/M, donde podrían funcionar como un último recurso para la tolerancia de las lesiones (Figura D3).

7. La localización de Rad5 está regulada en respuesta a la presencia de daño en el DNA

El análisis de la regulación de Rad5 en el ciclo celular que hemos realizado ha indicado también que el aumento de los niveles de esta proteína durante la fase S debe

ser suficiente para la tolerancia del daño exógeno, al menos hasta el grado inducido en este trabajo, ya que no se observan cambios significativos en la expresión de la proteína tras el tratamiento con MMS. No obstante, en respuesta a estas condiciones de estrés genotóxico, Rad5, que en ausencia de daño en el DNA se encuentra dispersa en el núcleo, se acumula y forma focos nucleares. Además, esta relocalización de Rad5 ocurre en la fase S, pero no en G2/M, lo que estaría de acuerdo con el papel fundamental que hemos mostrado para Rad5 durante la replicación de un DNA dañado. La formación de focos de Rad5 se observa también en las células que portan versiones mutantes de la proteína -Rad5-I916A, Rad5-GAA y Rad5-I916A/GAA- y es, por tanto, independiente de las actividades catalíticas de la proteína.

Nuestros resultados muestran también, que Rad5 se relocaliza específicamente en respuesta a ciertos tipos de daño, formando focos tras el tratamiento de las células con MMS o H₂O₂, pero no después de tratar las células con luz UV, reflejando probablemente el pequeño papel que juega Rad5, en comparación con TLS en la tolerancia de las lesiones causadas por tratamiento agudo con luz UV (Daigaku *et al*, 2010). Por otra parte, hemos encontrado que la acumulación de Rad5 es una respuesta específica a las lesiones en el DNA que bloquean las horquillas de replicación. Así, la formación de focos de Rad5 no es simplemente una consecuencia de la parada de las horquillas de replicación, ya que no se observa bajo condiciones de estrés replicativo que no van asociadas a lesiones en el DNA, como el tratamiento con hidroximetilurea. La acumulación de Rad5 es por tanto una respuesta a la presencia de daño en el material genético durante la replicación cromosómica. Por otra parte, los estudios que hemos llevado a cabo indican que la formación de focos de Rad5 ocurre independientemente de Rad18 y, por lo tanto, no requiere su reclutamiento por esta proteína o la ubiquitilación de PCNA que se produce en situaciones de daño en el DNA. Estos datos estarían de acuerdo con la observación de que la asociación de Rad5 y Rad18 a la cromatina se produce de forma independiente, a pesar de su colocalización (Ulrich y Jentsch, 2000). Este modo independiente de localización permitiría probablemente una rápida respuesta celular, que podría coincidir con el reclutamiento de Rad18 y la monoubiquitilación de PCNA, la cual podría facilitar el acceso de Rad5 a los sitios de daño y la inmediata poliubiquitilación de PCNA, lo que iniciaría de forma eficiente los mecanismos de *baipás* por intercambio de molde, al mismo tiempo que dificultaría el posible acceso de las polimerasas de TLS a las lesiones.

Asimismo, nuestros estudios han mostrado que los focos de Rad5 se forman también en ausencia del *checkpoint* de la fase S, lo que indica que ambos procesos constituyen rutas de señalización independientes, aunque respondan a similares estímulos. Por tanto, la activación de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA,

tanto en lo referente a la ubiquitilación de PCNA por Rad18/Rad6, como se ha explicado en la Introducción, como con respecto a la acumulación de Rad5, son independientes de la señalización del *checkpoint* de la fase S.

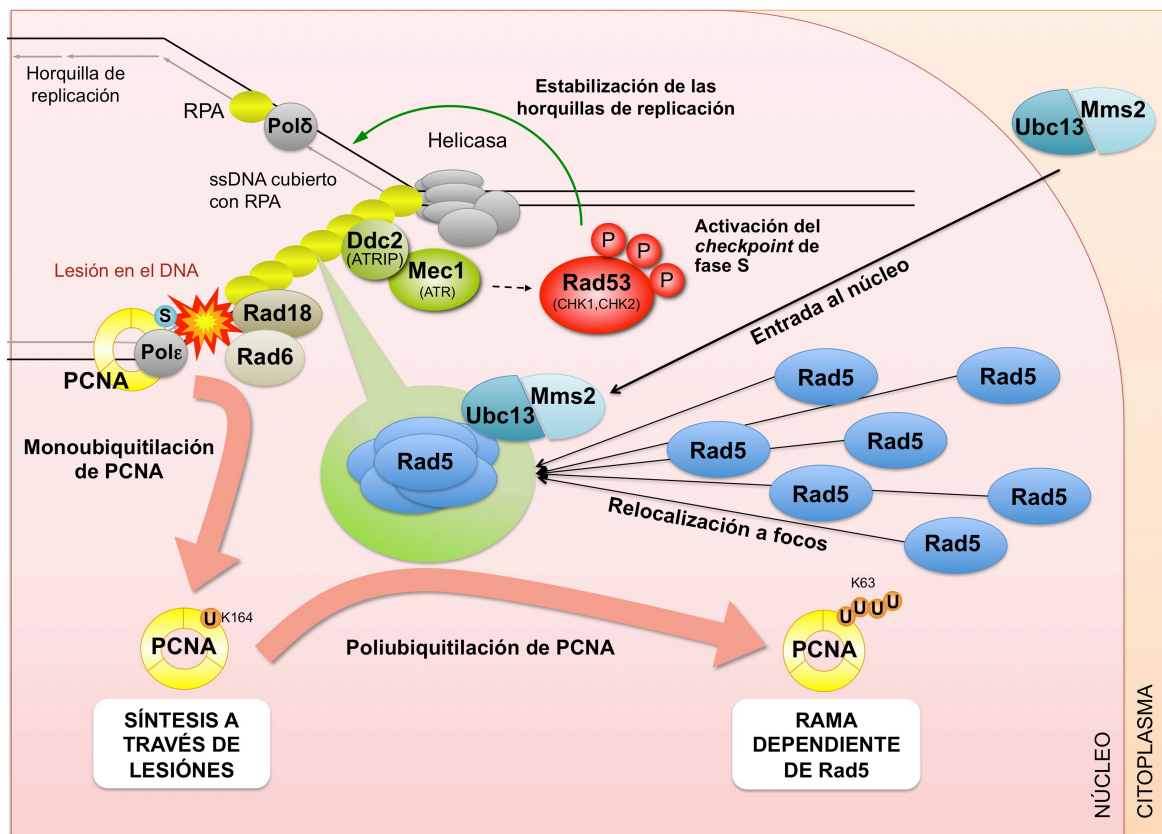


Figura D4. Regulación simultánea e independiente del *checkpoint* y distintos componentes de la ruta de tolerancia al daño *RAD6/RAD18*. Las lesiones que bloquean la horquilla de replicación provocan un desacoplamiento de la helicasa y polimerasas replicativas que da lugar a la exposición de DNA de cadena sencilla recubierto por RPA, lo cual origina la activación del *checkpoint* de fase S mientras que simultáneamente se produce la monoubiquitilación de PCNA por Rad18 y Rad6, la relocalización de Rad5 a focos nucleares y la translocación al núcleo del complejo Ubc13/Mms2, lo que permitirá la poliubiquitilación de PCNA y la actuación de la rama dependiente de Rad5 para permitir la replicación del DNA metilado.

En conjunto, nuestros resultados amplían nuestra comprensión sobre cómo está regulada la ruta dependiente de Rad5 en respuesta a la presencia de lesiones en el material genético. Proponemos que, como consecuencia del daño en el DNA, Rad18 se recluta a la cromatina y que Rad5, de forma independiente, se relocaliza dentro del núcleo y forma focos en la fase S. Al mismo tiempo, sus enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina complementarias, Ubc13 y Mms2, se relocalizan desde el citoplasma al núcleo (Ulrich y Jentsch, 2000), todo ello ocurriendo en paralelo pero independientemente de la activación del *checkpoint* de la fase S (Figura D4). Es posible que la acumulación de Rad5 en focos discretos facilite su interacción con Rad18 y Ubc13/Mms2, así como el

acceso a las lesiones en el DNA, contribuyendo así al proceso de tolerancia al daño en el DNA libre de error.

8. Rad5 puede actuar después de que la mayor parte del genoma se haya replicado

Los datos que se presentan en esta tesis indican que Rad5 lleva a cabo su función durante la replicación cromosómica, y que tiene un papel directo en las horquillas de replicación, confirmando su posible papel asociado a la maquinaria replicativa. Sin embargo, como se explica en la Introducción, se ha demostrado que TLS y los mecanismos de tolerancia al daño libres de error son funcionales después de que se haya completado la replicación de la mayor parte del genoma (Daigaku *et al*, 2010; Karras y Jentsch, 2010), probablemente rellenando los huecos de cadena sencilla que quedan cuando las horquillas reinician la replicación al otro lado de las lesiones. De acuerdo con dichos trabajos, nuestros resultados también indican que la función de Rad5 puede llevarse a cabo después de que la replicación de la mayor parte del DNA se haya llevado a cabo, al final de la fase S. En nuestros experimentos mostramos que las consecuencias de la exposición al MMS en células que no tienen la proteína Rad5 son en gran parte reversibles por la nueva expresión de la misma, no solo durante la fase S, sino incluso después de la replicación de la mayor parte del genoma. Estos datos podrían apoyar una actuación post-replicativa de la rama de tolerancia al daño en el DNA dependiente de Rad5, sugiriendo que su función no estaría solo asociada a las horquillas de replicación, sino que podría actuar promoviendo que se completen los huecos dejados en la nueva cadena frente a las lesiones. Igualmente, es posible que cuando Rad5 se expresa *de novo*, actúe simplemente sobre horquillas que se han mantenido bloqueadas por una lesión mientras progresaba el conjunto de la replicación, permitiendo que la horquilla detenida reinicie su avance.

Por otra parte, el hecho de que tras eliminar el agente causante del daño se observe progresión de la replicación en las células carentes de Rad5 por citometría de flujo, mientras que el *checkpoint* permanece activo y por tanto inhibiendo el disparo de orígenes tardíos, sugiere que la replicación que se observa puede ser debida a un reinicio de las horquillas de replicación después de las lesiones. Este proceso dejaría huecos (*gaps*) en una de las cadenas, al menos en una parte significativa de la población, que en ausencia de Rad5 no podrían rellenarse, lo cual sugiere que un modo de actuación post-replicativo de Rad5 también es posible.

Como ya se mencionó en la Introducción, la actuación de Rad5 en las horquillas de replicación o detrás de las mismas es aún un tema para el debate. Independientemente de si DDT puede funcionar de una u otra forma, la acción mediada por Rad5 ocurriría de forma parecida en cualquier caso, probablemente a través de un

mecanismo de recombinación, dando lugar a estructuras de DNA con forma de X que implican uniones de cromátidas hermanas (Branzei *et al*, 2008; Minca y Kowalski, 2010). El hecho de que además Rad5 actúe directamente en las horquillas de replicación deja abierta también la posibilidad de que esta proteína actúe facilitando la regresión de las horquillas de replicación bloqueadas, como se ha explicado anteriormente.

Nuestros resultados indican que la progresión de las horquillas de replicación es defectiva en ausencia de Rad5, y que necesita las actividades catalíticas de esta proteína, lo cual es una fuerte indicación de que Rad5 tiene un papel en las horquillas. Del mismo modo, también mostramos que Rad5 puede actuar tras la replicación de la mayor parte del genoma, lo que sugiere, pero no implica, que el modo de acción post-replicativo es también posible. Teniendo en cuenta todo lo anterior, proponemos que la rama libre de error dependiente de Rad5 de la ruta *RAD6/RAD18* funciona habitualmente durante la fase S, y que puede actuar tanto en las horquillas como por detrás de la replicación en curso, probablemente dependiendo del tipo específico de lesión o del sitio particular del daño. Todo esto pone de manifiesto un robusto sistema libre de error de tolerancia al daño en el DNA que probablemente actúe principalmente durante la fase S, asociado a la replicación, pero que también podría funcionar incluso cuando se ha completado la síntesis del grueso del DNA.

9. La tolerancia al daño en el DNA y su implicación en cáncer

La eficiente función de Rad5 es crítica para el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la viabilidad celular cuando las células sufren daño en el DNA. Evita el riesgo de mutagénesis, la cual está directamente relacionada con el desarrollo del cáncer (Alexandrov *et al*, 2013; Nik-Zainal *et al*, 2012). De hecho, *HLTF*, uno de los ortólogos humanos de *RAD5*, se encuentra frecuentemente inactivado en varios tipos de cáncer, y se propone como un potencial gen supresor de tumores. Por otra parte, el promotor de *HLTF* se encuentra metilado en el 43% de los tumores primarios de colon, lo que indica que la inactivación de *HLTF* es un suceso frecuente en la tumorigénesis de colon (Moinova *et al*, 2002), y también se ha observado metilación en la región promotora de *HLTF* en cánceres del tracto digestivo o uterinos (Debauve *et al*, 2008; Fukuoka *et al*, 2006; Hibi *et al*, 2003; Leung *et al*, 2003; Oue *et al*, 2006). Asimismo, los niveles de *HLTF* son muy bajos en algunas líneas celulares cancerosas (MacKay *et al*, 2009). Es más, también se ha observado sobreexpresión de varias formas truncadas de *HLTF* en varios tipos de cáncer, que podrían actuar como dominantes negativos (Capouillez *et al*, 2009; Capouillez *et al*, 2011). *SHPRH*, el segundo ortólogo humano de *RAD5*, se encuentra mutado en distintas líneas cancerosas (Sood *et al*, 2003). En estas situaciones, al estar ausente la rama libre de error, cobraría mayor importancia la rama de TLS, lo que a su

vez aumentaría la mutagénesis contribuyendo al proceso transformante de estas células. Aunque aún son necesarios más estudios que clarifiquen el papel de HTLF y de SHPRH, la extrapolación de algunos de los resultados obtenidos en esta tesis a células humanas implicaría que determinadas células tumorales serían extremadamente sensibles a algunas de las drogas que interfieren con la replicación del DNA, debido a sus defectos en la rama libre de error de la ruta *RAD6/RAD18*. Estos defectos podrían, en principio, explotarse para mejorar algunas estrategias en el tratamiento del cáncer. De hecho, la modulación de los mecanismos de tolerancia al daño en el DNA se perfila como un complemento esperanzador a la quimioterapia antitumoral convencional (Lange *et al*, 2011; Sale, 2013).

CONCLUSIONES

1. La tolerancia al daño en el DNA originado por el agente alquilante metil metanosulfonato durante la fase S se lleva a cabo principalmente por la rama libre de errores de la ruta *RAD6/RAD18*, mediada por Rad5, mientras que la contribución de la síntesis a través de lesiones a esta respuesta celular es muy minoritaria.
2. Rad5 es estrictamente necesaria para la progresión de las horquillas de replicación a través de un DNA dañado por MMS.
3. Las actividades E3 ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 son necesarias para la función de esta proteína en la tolerancia al daño en el DNA durante la replicación cromosómica.
4. Las actividades E3 ubiquitina-ligasa y ATPasa/helicasa de Rad5 no son independientes, sino que operan de forma secuencial.
5. Rad5 está regulada en el ciclo celular y muestra un pico de expresión en la fase S, lo cual apoya el papel de esta proteína durante la replicación cromosómica.
6. Los niveles de Rad5 no están regulados en respuesta al daño en el DNA, pero la proteína se relocaliza formando focos nucleares como consecuencia de la presencia de lesiones en el material genético, lo cual puede facilitar su función.
7. La relocalización de Rad5 bajo condiciones de daño en el DNA no requiere de su actividad catalítica, y es independiente de Rad18 -y por tanto de la ubiquitilación de PCNA-, así como de la actuación del *checkpoint* de la fase S.
8. Rad5 ejerce su función principalmente durante la fase S y tiene un papel directo en las horquillas de replicación, si bien puede actuar una vez que la mayor parte del genoma se ha replicado, al final de la fase S, lo que deja abierta la posibilidad de que también actúe de forma post-replicativa, como se ha propuesto por otros autores.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulovic A, Kim N, Jinks-Robertson S (2006) Mutagenesis and the three R's in yeast. *DNA Repair (Amst)* **5**: 409-421
- Acharya N, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (2006) Complex formation with Rev1 enhances the proficiency of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase zeta for mismatch extension and for extension opposite from DNA lesions. *Mol Cell Biol* **26**: 9555-9563
- Aguilera A, Gomez-Gonzalez B (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* **9**: 204-217
- Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Borresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjord JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilcic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jager N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, Lopez-Otin C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdes-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**: 415-421
- Allen JB, Zhou Z, Siede W, Friedberg EC, Elledge SJ (1994) The SAD1/RAD53 protein kinase controls multiple checkpoints and DNA damage-induced transcription in yeast. *Genes Dev* **8**: 2401-2415
- Amunugama R, Fishel R (2012) Homologous recombination in eukaryotes. *Progress in molecular biology and translational science* **110**: 155-206
- Andersen PL, Xu F, Xiao W (2008) Eukaryotic DNA damage tolerance and translesion synthesis through covalent modifications of PCNA. *Cell Res* **18**: 162-173
- Bailly V, Lauder S, Prakash S, Prakash L (1997) Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem* **272**: 23360-23365
- Ball LG, Xu X, Blackwell S, Hanna MD, Lambrecht AD, Xiao W (2014) The Rad5 helicase activity is dispensable for error-free DNA post-replication repair. *DNA Repair (Amst)* **16**: 74-83
- Ball LG, Zhang K, Cobb JA, Boone C, Xiao W (2009) The yeast Shu complex couples error-free post-replication repair to homologous recombination. *Mol Microbiol* **73**: 89-102
- Barnes DE, Lindahl T (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* **38**: 445-476
- Bianchi J, Rudd SG, Jozwiakowski SK, Bailey LJ, Soura V, Taylor E, Stevanovic I, Green AJ, Stracker TH, Lindsay HD, Doherty AJ (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication. *Mol Cell* **52**: 566-573
- Bienko M, Green CM, Crosetto N, Rudolf F, Zapart G, Coull B, Kannouche P, Wider G, Peter M, Lehmann AR, Hofmann K, Dikic I (2005) Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis. *Science* **310**: 1821-1824
- Bienko M, Green CM, Sabbioneda S, Crosetto N, Matic I, Hibbert RG, Begovic T, Niimi A, Mann M, Lehmann AR, Dikic I (2010) Regulation of translesion synthesis DNA polymerase eta by monoubiquitination. *Mol Cell* **37**: 396-407
- Blastyak A, Hajdu I, Unk I, Haracska L (2010) Role of double-stranded DNA translocase activity of human HLTF in replication of damaged DNA. *Mol Cell Biol* **30**: 684-693

- Blastyak A, Pinter L, Unk I, Prakash L, Prakash S, Haracska L (2007) Yeast Rad5 protein required for postreplication repair has a DNA helicase activity specific for replication fork regression. *Mol Cell* **28**: 167-175
- Boiteux S, Jinks-Robertson S (2013) DNA repair mechanisms and the bypass of DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **193**: 1025-1064
- Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 297-308
- Branzei D, Foiani M (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 208-219
- Branzei D, Vanoli F, Foiani M (2008) SUMOylation regulates Rad18-mediated template switch. *Nature* **456**: 915-920
- Broomfield S, Chow BL, Xiao W (1998) MMS2, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5678-5683
- Budd ME, Campbell JL (1995) DNA polymerases required for repair of UV-induced damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**: 2173-2179
- Byun TS, Pacek M, Yee MC, Walter JC, Cimprich KA (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* **19**: 1040-1052
- Callegari AJ, Clark E, Pneuman A, Kelly TJ (2010) Postreplication gaps at UV lesions are signals for checkpoint activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 8219-8224
- Capouillez A, Debaube G, Decaestecker C, Filleul O, Chevalier D, Mortuaire G, Coppee F, Leroy X, Belayew A, Saussez S (2009) The helicase-like transcription factor is a strong predictor of recurrence in hypopharyngeal but not in laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology* **55**: 77-90
- Capouillez A, Noel JC, Arafa M, Arcolia V, Mouallif M, Guenin S, Delvenne P, Belayew A, Saussez S (2011) Expression of the helicase-like transcription factor and its variants during carcinogenesis of the uterine cervix: implications for tumour progression. *Histopathology* **58**: 984-988
- Casali P, Pal Z, Xu Z, Zan H (2006) DNA repair in antibody somatic hypermutation. *Trends in immunology* **27**: 313-321
- Centore RC, Yazinski SA, Tse A, Zou L (2012) Spartan/C1orf124, a reader of PCNA ubiquitylation and a regulator of UV-induced DNA damage response. *Mol Cell* **46**: 625-635
- Chang DJ, Cimprich KA (2009) DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol* **5**: 82-90
- Chang DJ, Lupardus PJ, Cimprich KA (2006) Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities. *J Biol Chem* **281**: 32081-32088
- Chang M, Bellaoui M, Zhang C, Desai R, Morozov P, Delgado-Cruzata L, Rothstein R, Freyer GA, Boone C, Brown GW (2005) RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *EMBO J* **24**: 2024-2033
- Chatterjee N, Siede W (2013) Replicating damaged DNA in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a019836

- Chen J, Derfler B, Samson L (1990) *Saccharomyces cerevisiae* 3-methyladenine DNA glycosylase has homology to the AlkA glycosylase of *E. coli* and is induced in response to DNA alkylation damage. *EMBO J* **9**: 4569-4575.
- Chen S, Davies AA, Sagan D, Ulrich HD (2005) The RING finger ATPase Rad5p of *Saccharomyces cerevisiae* contributes to DNA double-strand break repair in a ubiquitin-independent manner. *Nucleic Acids Res* **33**: 5878-5886
- Ciccio A, Nimmonkar AV, Hu Y, Hajdu I, Achar YJ, Izhar L, Petit SA, Adamson B, Yoon JC, Kowalczykowski SC, Livingston DM, Haracska L, Elledge SJ (2012) Polyubiquitinated PCNA recruits the ZRANB3 translocase to maintain genomic integrity after replication stress. *Mol Cell* **47**: 396-409
- Clerici M, Mantiero D, Lucchini G, Longhese MP (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J Biol Chem* **280**: 38631-38638
- Cook JS (1970) Photoreactivation in animal cells. *Photophysiology* **5**: 191-233
- Coulon S, Ramasubramanyan S, Alies C, Philippin G, Lehmann A, Fuchs RP (2010) Rad8Rad5/Mms2-Ubc13 ubiquitin ligase complex controls translesion synthesis in fission yeast. *EMBO J* **29**: 2048-2058
- Crosetto N, Bienko M, Hibbert RG, Perica T, Ambrogio C, Kensche T, Hofmann K, Sixma TK, Dikic I (2008) Human Wrip1 is localized in replication factories in a ubiquitin-binding zinc finger-dependent manner. *J Biol Chem* **283**: 35173-35185
- Daigaku Y, Davies AA, Ulrich HD (2010) Ubiquitin-dependent DNA damage bypass is separable from genome replication. *Nature* **465**: 951-955
- Daley JM, Palmboos PL, Wu D, Wilson TE (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**: 431-451
- Daraba A, Gali VK, Halmai M, Haracska L, Unk I (2014) Def1 promotes the degradation of Pol3 for polymerase exchange to occur during DNA-damage--induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* **12**: e1001771
- Davies AA, Huttner D, Daigaku Y, Chen S, Ulrich HD (2008) Activation of ubiquitin-dependent DNA damage bypass is mediated by replication protein a. *Mol Cell* **29**: 625-636
- Davis EJ, Lachaud C, Appleton P, Macartney TJ, Nathke I, Rouse J (2012) DVC1 (C1orf124) recruits the p97 protein segregase to sites of DNA damage. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1093-1100
- de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **13**: 768-785
- Debaube G, Capouillez A, Belayew A, Saussez S (2008) The helicase-like transcription factor and its implication in cancer progression. *Cell Mol Life Sci* **65**: 591-604
- Diamant N, Hendel A, Vered I, Carell T, Reissner T, de Wind N, Geaciov N, Livneh Z (2012) DNA damage bypass operates in the S and G2 phases of the cell cycle and exhibits differential mutagenicity. *Nucleic Acids Res* **40**: 170-180
- Diani L, Colombelli C, Nachimuthu BT, Donnianni R, Plevani P, Muzi-Falconi M, Pelliccioli A (2009) *Saccharomyces* CDK1 phosphorylates Rad53 kinase in metaphase, influencing cellular morphogenesis. *J Biol Chem* **284**: 32627-32634
- Durando M, Tateishi S, Vaziri C (2013) A non-catalytic role of DNA polymerase eta in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks. *Nucleic Acids Res* **41**: 3079-3093

- Edmunds CE, Simpson LJ, Sale JE (2008) PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40. *Mol Cell* **30**: 519-529
- Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD (1997) Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* **16**: 6559-6573
- Falbo KB, Alabert C, Katou Y, Wu S, Han J, Wehr T, Xiao J, He X, Zhang Z, Shi Y, Shirahige K, Pasero P, Shen X (2009) Involvement of a chromatin remodeling complex in damage tolerance during DNA replication. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 1167-1172
- Foiani M, Marini F, Gamba D, Lucchini G, Plevani P (1994) The B subunit of the DNA polymerase alpha-primase complex in *Saccharomyces cerevisiae* executes an essential function at the initial stage of DNA replication. *Mol Cell Biol* **14**: 923-933
- Foster PL (2007) Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **42**: 373-397
- Friedberg EC (2005) Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 943-953
- Friedberg EC, Wagner R, Radman M (2002) Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. *Science* **296**: 1627-1630
- Friedel AM, Pike BL, Gasser SM (2009) ATR/Mec1: coordinating fork stability and repair. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 237-244
- Fukuoka T, Hibi K, Nakao A (2006) Aberrant methylation is frequently observed in advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* **26**: 3333-3335
- Galhardo RS, Hastings PJ, Rosenberg SM (2007) Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **42**: 399-435
- Gallego-Sanchez A, Andres S, Conde F, San-Segundo PA, Bueno A (2012) Reversal of PCNA ubiquitylation by Ubp10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **8**: e1002826
- Gallego-Sanchez A, Ufano S, Andres S, Bueno A (2013) Analysis of the tolerance to DNA alkylating damage in MEC1 and RAD53 checkpoint mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **8**: e81108
- Gangavarapu V, Haracska L, Unk I, Johnson RE, Prakash S, Prakash L (2006) Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 7783-7790
- Gangavarapu V, Prakash S, Prakash L (2007) Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**: 7758-7764
- Garcia-Gomez S, Reyes A, Martinez-Jimenez MI, Chocron ES, Mouron S, Terrados G, Powell C, Salido E, Mendez J, Holt IJ, Blanco L (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells. *Molecular cell* **52**: 541-553
- Gellon L, Barbey R, Auffret van der Kemp P, Thomas D, Boiteux S (2001) Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **265**: 1087-1096
- Ghosal G, Leung JW, Nair BC, Fong KW, Chen J (2012) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding protein C1orf124 is a regulator of translesion synthesis. *J Biol Chem* **287**: 34225-34233

- Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425
- Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W (2011) DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a000745
- Gohler T, Sabbioneda S, Green CM, Lehmann AR (2011) ATR-mediated phosphorylation of DNA polymerase η is needed for efficient recovery from UV damage. *J Cell Biol* **192**: 219-227
- Gonzalez-Huici V, Szakal B, Urulangodi M, Psakhye I, Castellucci F, Menolfi D, Rajakumara E, Fumasoni M, Bermejo R, Jentsch S, Brnzei D (2014) DNA bending facilitates the error-free DNA damage tolerance pathway and upholds genome integrity. *EMBO J* **33**: 327-340
- Groth P, Auslander S, Majumder MM, Schultz N, Johansson F, Petermann E, Helleday T (2010) Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage. *J Mol Biol* **402**: 70-82
- Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524
- Guzder SN, Sung P, Prakash L, Prakash S (1996) Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and not by a pre-assembled repairosome. *J Biol Chem* **271**: 8903-8910
- Halas A, Podlaska A, Derkacz J, McIntyre J, Skoneczna A, Sledziwska-Gojska E (2011) The roles of PCNA SUMOylation, Mms2-Ubc13 and Rad5 in translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **80**: 786-797
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Harfe BD, Jinks-Robertson S (2000) DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet* **34**: 359-399
- Hefferin ML, Tomkinson AE (2005) Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**: 639-648
- Hendel A, Krijger PH, Diamant N, Goren Z, Langerak P, Kim J, Reissner T, Lee KY, Geacintov NE, Carell T, Myung K, Tateishi S, D'Andrea A, Jacobs H, Livneh Z (2011) PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Genet* **7**: e1002262
- Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet* **44**: 113-139
- Hibi K, Nakayama H, Kanyama Y, Kodera Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A (2003) Methylation pattern of HMTF gene in digestive tract cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer* **104**: 433-436
- Higgins NP, Kato K, Strauss B (1976) A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol* **101**: 417-425.
- Hirano Y, Sugimoto K (2006) ATR homolog Mec1 controls association of DNA polymerase ζ -Rev1 complex with regions near a double-strand break. *Curr Biol* **16**: 586-590
- Hishida T, Kubota Y, Carr AM, Iwasaki H (2009) RAD6-RAD18-RAD5-pathway-dependent tolerance to chronic low-dose ultraviolet light. *Nature* **457**: 612-615

Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**: 135-141

Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374

Hsieh P, Yamane K (2008) DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* **129**: 391-407

Huang D, Piening BD, Paulovich AG (2013) The preference for error-free or error-prone postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to low-dose methyl methanesulfonate is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* **33**: 1515-1527

Huang TT, Nijman SM, Mirchandani KD, Galardy PJ, Cohn MA, Haas W, Gygi SP, Ploegh HL, Bernards R, D'Andrea AD (2006) Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. *Nat Cell Biol* **8**: 339-347

Husain I, Griffith J, Sancar A (1988) Thymine dimers bend DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2558-2562

Ira G, Malkova A, Liberi G, Foiani M, Haber JE (2003) Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell* **115**: 401-411

Iyer LM, Babu MM, Aravind L (2006) The HIRAN domain and recruitment of chromatin remodeling and repair activities to damaged DNA. *Cell Cycle* **5**: 775-782

Izhar L, Ziv O, Cohen IS, Geacintov NE, Livneh Z (2013) Genomic assay reveals tolerance of DNA damage by both translesion DNA synthesis and homology-dependent repair in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: E1462-1469

Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**: 947-962

Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 335-346

Johnson RE, Henderson ST, Petes TD, Prakash S, Bankmann M, Prakash L (1992) *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol Cell Biol* **12**: 3807-3818

Johnson RE, Kondratieck CM, Prakash S, Prakash L (1999a) hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science* **285**: 263-265

Johnson RE, Prakash S, Prakash L (1999b) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol η . *Science* **283**: 1001-1004

Juhasz S, Balogh D, Hajdu I, Burkovics P, Villamil MA, Zhuang Z, Haracska L (2012) Characterization of human Spartan/C1orf124, an ubiquitin-PCNA interacting regulator of DNA damage tolerance. *Nucleic Acids Res* **40**: 10795-10808

Jung YS, Hakem A, Hakem R, Chen X (2011) Pirh2 E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates DNA polymerase η to suppress translesion DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **31**: 3997-4006

Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR (2004) Interaction of human DNA polymerase η with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell* **14**: 491-500

- Karras GI, Fumasoni M, Sienski G, Vanoli F, Branzei D, Jentsch S (2013) Noncanonical role of the 9-1-1 clamp in the error-free DNA damage tolerance pathway. *Molecular cell* **49**: 536-546
- Karras GI, Jentsch S (2010) The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase. *Cell* **141**: 255-267
- Kass EM, Jasin M (2010) Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* **584**: 3703-3708
- Kim H, Dejsuphong D, Adelmant G, Ceccaldi R, Yang K, Marto JA, D'Andrea AD (2014) Transcriptional repressor ZBTB1 promotes chromatin remodeling and translesion DNA synthesis. *Mol Cell* **54**: 107-118
- King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW (1996) How Proteolysis Drives the Cell Cycle. *Science* **274**: 1652-1659
- Kolodner RD, Marsischky GT (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 89-96
- Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**: 233-271
- Kuang L, Kou H, Xie Z, Zhou Y, Feng X, Wang L, Wang Z (2013) A non-catalytic function of Rev1 in translesion DNA synthesis and mutagenesis is mediated by its stable interaction with Rad5. *DNA Repair (Amst)* **12**: 27-37
- Kunkel TA (2004) DNA replication fidelity. *J Biol Chem* **279**: 16895-16898
- Kunkel TA, Bebenek K (2000) DNA replication fidelity. *Annu Rev Biochem* **69**: 497-529
- Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* **74**: 681-710
- Labib K, Diffley JFX, Kearsey SE (1999) G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA-replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat Cell Biol* **1**: 415-422
- Lafrance-Vanasse J, Arseneault G, Cappadocia L, Chen HT, Legault P, Omichinski JG (2012) Structural and functional characterization of interactions involving the Tfb1 subunit of TFIIH and the NER factor Rad2. *Nucleic Acids Res* **40**: 5739-5750
- Lange SS, Takata K, Wood RD (2011) DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**: 96-110
- Larson K, Sahm J, Shenkar R, Strauss B (1985) Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication. *Mutat Res* **150**: 77-84
- Lawrence CW (2002) Cellular roles of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *DNA Repair (Amst)* **1**: 425-435
- Lehmann AR, Niimi A, Ogi T, Brown S, Sabbioneda S, Wing JF, Kannouche PL, Green CM (2007) Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair (Amst)* **6**: 891-899
- Lengsfeld BM, Rattray AJ, Bhaskara V, Ghirlando R, Paull TT (2007) Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Mol Cell* **28**: 638-651
- Leung WK, Yu J, Bai AH, Chan MW, Chan KK, To KF, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ (2003) Inactivation of helicase-like transcription factor by promoter hypermethylation in human gastric cancer. *Molecular carcinogenesis* **37**: 91-97
- Liberi G, Maffioletti G, Lucca C, Chiolo I, Baryshnikova A, Cotta-Ramusino C, Lopes M, Pelliccioli A, Haber JE, Foiani M (2005) Rad51-dependent DNA structures accumulate at damaged replication

- forks in sgs1 mutants defective in the yeast ortholog of BLM RecQ helicase. *Genes Dev* **19**: 339-350
- Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* **283**: 1-5
- Lieber MR (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**: 181-211
- Lin JR, Zeman MK, Chen JY, Yee MC, Cimprich KA (2011) SHPRH and HLTf act in a damage-specific manner to coordinate different forms of postreplication repair and prevent mutagenesis. *Mol Cell* **42**: 237-249
- Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961.
- Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pellicoli A, Liberi G, Plevani P, Muzi-Falconi M, Newlon C, Foiani M (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**: 557-561
- Lopes M, Foiani M, Sogo JM (2006) Multiple mechanisms control chromosome integrity after replication fork uncoupling and restart at irreparable UV lesions. *Mol Cell* **21**: 15-27
- MacKay C, Toth R, Rouse J (2009) Biochemical characterisation of the SWI/SNF family member HLTf. *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 187-191
- Masuda Y, Ohmae M, Masuda K, Kamiya K (2003) Structure and enzymatic properties of a stable complex of the human REV1 and REV7 proteins. *J Biol Chem* **278**: 12356-12360
- Masutani C, Kusumoto R, Yamada A, Dohmae N, Yokoi M, Yuasa M, Araki M, Iwai S, Takio K, Hanaoka F (1999) The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase η . *Nature* **399**: 700-704
- McCarroll RM, Fangman WL (1988) Time of replication of yeast centromeres and telomeres. *Cell* **54**: 505-513
- Melo JA, Cohen J, Toczyski DP (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* **15**: 2809-2821
- Minca EC, Kowalski D (2010) Multiple Rad5 activities mediate sister chromatid recombination to bypass DNA damage at stalled replication forks. *Mol Cell* **38**: 649-661
- Moinova HR, Chen WD, Shen L, Smiraglia D, Olechnowicz J, Ravi L, Kasturi L, Myeroff L, Plass C, Parsons R, Minna J, Willson JK, Green SB, Issa JP, Markowitz SD (2002) HLTf gene silencing in human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4562-4567
- Mosbech A, Gibbs-Seymour I, Kagias K, Thorslund T, Beli P, Povlsen L, Nielsen SV, Smedegaard S, Sedgwick G, Lukas C, Hartmann-Petersen R, Lukas J, Choudhary C, Pocock R, Bekker-Jensen S, Mailand N (2012) DVC1 (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1084-1092
- Motegi A, Liaw HJ, Lee KY, Roest HP, Maas A, Wu X, Moinova H, Markowitz SD, Ding H, Hoeijmakers JH, Myung K (2008) Polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTf and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 12411-12416
- Motegi A, Sood R, Moinova H, Markowitz SD, Liu PP, Myung K (2006) Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J Cell Biol* **175**: 703-708

- Mouron S, Rodriguez-Acebes S, Martinez-Jimenez MI, Garcia-Gomez S, Chocron S, Blanco L, Mendez J (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 1383-1389
- Mullen JR, Nallaseth FS, Lan YQ, Slagle CE, Brill SJ (2005) Yeast Rmi1/Nce4 controls genome stability as a subunit of the Sgs1-Top3 complex. *Mol Cell Biol* **25**: 4476-4487
- Murakami-Sekimata A, Huang D, Piening BD, Bangur C, Paulovich AG (2010) The *Saccharomyces cerevisiae* RAD9, RAD17 and RAD24 genes are required for suppression of mutagenic post-replicative repair during chronic DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **9**: 824-834
- Nedelcheva MN, Roguev A, Dolapchiev LB, Shevchenko A, Taskov HB, Shevchenko A, Stewart AF, Stoyanov SS (2005) Uncoupling of unwinding from DNA synthesis implies regulation of MCM helicase by Tof1/Mrc1/Csm3 checkpoint complex. *J Mol Biol* **347**: 509-521
- Niimi A, Chambers AL, Downs JA, Lehmann AR (2012) A role for chromatin remodellers in replication of damaged DNA. *Nucleic Acids Res* **40**: 7393-7403
- Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, Jones D, Hinton J, Marshall J, Stebbings LA, Menzies A, Martin S, Leung K, Chen L, Leroy C, Ramakrishna M, Rance R, Lau KW, Mudie LJ, Varela I, McBride DJ, Bignell GR, Cooke SL, Shlien A, Gamble J, Whitmore I, Maddison M, Tarpey PS, Davies HR, Papaemmanuil E, Stephens PJ, McLaren S, Butler AP, Teague JW, Jonsson G, Garber JE, Silver D, Miron P, Fatima A, Boyault S, Langerod A, Tutt A, Martens JW, Aparicio SA, Borg A, Salomon AV, Thomas G, Borresen-Dale AL, Richardson AL, Neuberger MS, Futreal PA, Campbell PJ, Stratton MR (2012) Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* **149**: 979-993
- Oue N, Mitani Y, Motoshita J, Matsumura S, Yoshida K, Kuniyasu H, Nakayama H, Yasui W (2006) Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. *Cancer* **106**: 1250-1259
- Pages V, Bresson A, Acharya N, Prakash S, Fuchs RP, Prakash L (2008) Requirement of Rad5 for DNA polymerase zeta-dependent translesion synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **180**: 73-82
- Pages V, Santa Maria SR, Prakash L, Prakash S (2009) Role of DNA damage-induced replication checkpoint in promoting lesion bypass by translesion synthesis in yeast. *Genes Dev* **23**: 1438-1449
- Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, Ulrich HD (2005) Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* **19**: 123-133
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 349-404
- Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* **66**: 1039-1056
- Parker JL, Ulrich HD (2012) A SUMO-interacting motif activates budding yeast ubiquitin ligase Rad18 towards SUMO-modified PCNA. *Nucleic Acids Res* **40**: 11380-11388
- Paulovich AG, Hartwell LH (1995) A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* **82**: 841-847
- Pearlman DA, Holbrook SR, Pirkle DH, Kim SH (1985) Molecular models for DNA damaged by photoreaction. *Science* **227**: 1304-1308

- Pelliccioli A, Lucca C, Liberi G, Marini F, Lopes M, Plevani P, Romano A, Di Fiore PP, Foiani M (1999) Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J* **18**: 6561-6572
- Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, Hoege C, Jentsch S (2005) SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* **436**: 428-433
- Popoff SC, Spira AI, Johnson AW, Demple B (1990) Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: homology to Escherichia coli endonuclease IV. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4193-4197
- Povlsen LK, Beli P, Wagner SA, Poulsen SL, Sylvestersen KB, Poulsen JW, Nielsen ML, Bekker-Jensen S, Mailand N, Choudhary C (2012) Systems-wide analysis of ubiquitylation dynamics reveals a key role for PAF15 ubiquitylation in DNA-damage bypass. *Nat Cell Biol* **14**: 1089-1098
- Prado F, Cortes-Ledesma F, Huertas P, Aguilera A (2003) Mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae. *Curr Genet* **42**: 185-198
- Reynolds AE, McCarroll RM, Newlon CS, Fangman WL (1989) Time of replication of ARS elements along yeast chromosome III. *Mol Cell Biol* **9**: 4488-4494
- Rose MD, Winston F, Hieter P (1989) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rupert CS (1975) Enzymatic photoreactivation: overview. *Basic Life Sci* **5A**: 73-87
- Sabbioneda S, Bortolomai I, Giannattasio M, Plevani P, Muzi-Falconi M (2007) Yeast Rev1 is cell cycle regulated, phosphorylated in response to DNA damage and its binding to chromosomes is dependent upon MEC1. *DNA Repair (Amst)* **6**: 121-127
- Sale JE (2013) Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a012708
- Sancar A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical reviews* **103**: 2203-2237
- Sanchez Y, Desany BA, Jones WJ, Liu Q, Wang B, Elledge SJ (1996) Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**: 357-360
- Santocanale C, Diffley JFX (1998) A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* **395**: 615-618
- Santocanale C, Sharma K, Diffley JFX (1999) Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes Dev* **13**: 2360-2364
- Sassanfar M, Dosanjh MK, Essigmann JM, Samson L (1991) Relative efficiencies of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O6-methylguanine and O4-methylthymine. Suggestive evidence for O4-methylthymine repair by eukaryotic methyltransferases. *J Biol Chem* **266**: 2767-2771
- Sassanfar M, Samson L (1990) Identification and preliminary characterization of an O6-methylguanine DNA repair methyltransferase in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* **265**: 20-25
- Saugar I, Parker JL, Zhao S, Ulrich HD (2012) The genome maintenance factor Mgs1 is targeted to sites of replication stress by ubiquitylated PCNA. *Nucleic Acids Res* **40**: 245-257
- Schiestl RH, Gietz RD (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**: 339-346

- Schleker T, Shimada K, Sack R, Pike BL, Gasser SM (2010) Cell cycle-dependent phosphorylation of Rad53 kinase by Cdc5 and Cdc28 modulates checkpoint adaptation. *Cell Cycle* **9**: 350-363
- Scott AD, Neishabury M, Jones DH, Reed SH, Boiteux S, Waters R (1999) Spontaneous mutation, oxidative DNA damage, and the roles of base and nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 205-218
- Segurado M, Tercero JA (2009) The S-phase checkpoint: targeting the replication fork. *Biol Cell* **101**: 617-627
- Shirahige K, Hori Y, Shiraishi K, Yamashita M, Takahashi K, Obuse C, Tsurimoto T, Yoshikawa H (1998) Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* **395**: 618-621
- Signon L, Malkova A, Naylor ML, Klein H, Haber JE (2001) Genetic requirements for RAD51- and RAD54-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Mol Cell Biol* **21**: 2048-2056
- Sikorski RS, Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27
- Sogo JM, Lopes M, Foiani M (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297**: 599-602
- Sood R, Makalowska I, Galdzicki M, Hu P, Eddings E, Robbins CM, Moses T, Namkoong J, Chen S, Trent JM (2003) Cloning and characterization of a novel gene, SHPRH, encoding a conserved putative protein with SNF2/helicase and PHD-finger domains from the 6q24 region. *Genomics* **82**: 153-161
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**: 3273-3297
- Stelter P, Ulrich HD (2003) Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* **425**: 188-191
- Sun Z, Fay DS, Marini F, Foiani M, Stern DF (1996) Spk1/Rad53 is regulated by Mec1-dependent protein phosphorylation in DNA replication and damage checkpoint pathways. *Genes Dev* **10**: 395-406
- Sung P, Klein H (2006) Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 739-750
- Swanson RL, Morey NJ, Doetsch PW, Jinks-Robertson S (1999) Overlapping specificities of base excision repair, nucleotide excision repair, recombination, and translesion synthesis pathways for DNA base damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 2929-2935
- Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 630-670
- Terai K, Abbas T, Jazaeri AA, Dutta A (2010) CRL4(Cdt2) E3 ubiquitin ligase monoubiquitinates PCNA to promote translesion DNA synthesis. *Mol Cell* **37**: 143-149
- Tercero JA (2009) Density transfer as a method to analyze the progression of DNA replication forks. *Methods Mol Biol* **521**: 203-213
- Tercero JA, Diffley JF (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**: 553-557
- Tercero JA, Labib K, Diffley JF (2000) DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p. *EMBO J* **19**: 2082-2093

- Tercero JA, Longhese MP, Diffley JF (2003) A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* **11**: 1323-1336
- Thomas BT, Rothstein R (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**: 619-630
- Tkach JM, Yimit A, Lee AY, Riffle M, Costanzo M, Jaschob D, Hendry JA, Ou J, Moffat J, Boone C, Davis TN, Nislow C, Brown GW (2012) Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *Nat Cell Biol* **14**: 966-976
- Torres-Ramos CA, Johnson RE, Prakash L, Prakash S (2000) Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 3522-3528
- Ulrich HD (2003) Protein-protein interactions within an E2-RING finger complex. Implications for ubiquitin-dependent DNA damage repair. *J Biol Chem* **278**: 7051-7058
- Ulrich HD (2005) The RAD6 pathway: control of DNA damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and SUMO. *ChemBiochem* **6**: 1735-1743
- Ulrich HD (2009) Regulating post-translational modifications of the eukaryotic replication clamp PCNA. *DNA Repair (Amst)* **8**: 461-469
- Ulrich HD (2011) Timing and spacing of ubiquitin-dependent DNA damage bypass. *FEBS Lett* **585**: 2861-2867
- Ulrich HD, Jentsch S (2000) Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J* **19**: 3388-3397
- Unk I, Hajdu I, Blastyak A, Haracska L (2010) Role of yeast Rad5 and its human orthologs, HLTf and SHPRH in DNA damage tolerance. *DNA Repair (Amst)* **9**: 257-267
- Unk I, Hajdu I, Fatyol K, Hurwitz J, Yoon JH, Prakash L, Prakash S, Haracska L (2008) Human HLTf functions as a ubiquitin ligase for proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 3768-3773
- Unk I, Hajdu I, Fatyol K, Szakal B, Blastyak A, Bermudez V, Hurwitz J, Prakash L, Prakash S, Haracska L (2006) Human SHPRH is a ubiquitin ligase for Mms2-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 18107-18112
- Vanoli F, Fumasoni M, Szakal B, Maloisel L, Branzei D (2010) Replication and recombination factors contributing to recombination-dependent bypass of DNA lesions by template switch. *PLoS Genet* **6**: e1001205
- Vazquez MV, Rojas V, Tercero JA (2008) Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *DNA Repair (Amst)* **7**: 1693-1704
- Wang Z, Wu X, Friedberg EC (1993) DNA repair synthesis during base excision repair in vitro is catalyzed by DNA polymerase epsilon and is influenced by DNA polymerases alpha and delta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 1051-1058
- Waters LS, Minesinger BK, Wiltout ME, D'Souza S, Woodruff RV, Walker GC (2009) Eukaryotic translesion polymerases and their roles and regulation in DNA damage tolerance. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 134-154
- Waters LS, Walker GC (2006) The critical mutagenic translesion DNA polymerase Rev1 is highly expressed during G(2)/M phase rather than S phase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8971-8976

- Weston R, Peeters H, Ahel D (2012) ZRANB3 is a structure-specific ATP-dependent endonuclease involved in replication stress response. *Genes Dev* **26**: 1558-1572
- Wu L, Hickson ID (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**: 870-874
- Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40**: 363-383
- Wyman C, Ristic D, Kanaar R (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **3**: 827-833
- Xiao W, Derfler B, Chen J, Samson L (1991) Primary sequence and biological functions of a *Saccharomyces cerevisiae* O6-methylguanine/O4-methylthymine DNA repair methyltransferase gene. *EMBO J* **10**: 2179-2186
- Yanagihara H, Kobayashi J, Tateishi S, Kato A, Matsuura S, Tauchi H, Yamada K, Takezawa J, Sugawara K, Masutani C, Hanaoka F, Weemaes CM, Mori T, Zou L, Komatsu K (2011) NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol eta-dependent translesion DNA synthesis. *Mol Cell* **43**: 788-797
- You Z, Kong L, Newport J (2002) The role of single-stranded DNA and polymerase alpha in establishing the ATR, Hus1 DNA replication checkpoint. *J Biol Chem* **277**: 27088-27093
- Yuan J, Ghosal G, Chen J (2012) The HARP-like domain-containing protein AH2/ZRANB3 binds to PCNA and participates in cellular response to replication stress. *Mol Cell* **47**: 410-421
- Zeman MK, Lin JR, Freire R, Cimprich KA (2014) DNA damage-specific deubiquitination regulates Rad18 functions to suppress mutagenesis. *J Cell Biol* **206**: 183-197
- Zhang H, Lawrence CW (2005) The error-free component of the *RAD6/RAD18* DNA damage tolerance pathway of budding yeast employs sister-strand recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15954-15959
- Zhang S, Chea J, Meng X, Zhou Y, Lee EY, Lee MY (2008) PCNA is ubiquitinated by RNF8. *Cell Cycle* **7**: 3399-3404
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433-439
- Zou L, Elledge SJ (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**: 1542-1548